

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

**HPLC analýza albendazolu a jeho metabolitů za
použití core-shell kolony**

**HPLC Analysis of Albendazole and Its Metabolites
Using a Core-Shell Column**

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Vladimír Kubíček, CSc.

Hradec Králové, 2014

Alena Králíková

Čestné prohlášení:

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a zdrojů a v práci řádně citovány.

.....

Datum

.....

Podpis

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Vladimíru Kubíčkovi, CSc. za odborné vedení diplomové práce, vstřícný přístup a konzultace, které mi poskytl při jejím vypracování.

Obsah

| | |
|--|----|
| Souhrn..... | 1 |
| Abstract..... | 2 |
| 2. TEORETICKÁ ČÁST | 5 |
| 2.1. Farmaceutické využití benzimidazolů | 6 |
| 2.2. HPLC ve farmaceutické analýze..... | 8 |
| 2.3. HPLC kolona Ascentis® Express RP-Amide..... | 11 |
| 3. PRAKTICKÁ ČÁST | 13 |
| 3.1. Chemikálie..... | 14 |
| 3.1.1. Sledovaná léčiva | 14 |
| 3.1.2. Další chemikálie | 15 |
| 3.2. Použité roztoky | 16 |
| 3.2.1. Příprava acetonitrilových zásobních roztoků ABZ, ABZSO, ABZSO ₂ , OXI | 16 |
| 3.2.2. Příprava fosfátového pufru 0,015 mol/l, pH=7,0..... | 16 |
| 3.2.3. Příprava roztoku kyseliny octové 0,1 mol/l | 16 |
| 3.3. Použité přístroje | 17 |
| 3.4. Podmínky měření..... | 18 |
| 4. VÝSLEDKY..... | 19 |
| 4.1. Složení mobilní fáze a zjištěné retenční časy ABZ, ABZSO, ABZSO ₂ a OXI | 20 |
| 4.2. Kalibrační křivky ABZ, ABZSO a ABZSO ₂ | 24 |
| 4.2.1. Kalibrační křivky ABZ, ABZSO a ABZSO ₂ , použitá mobilní fáze měla složení pufr:ACN=70:30 | 25 |
| 4.2.1.1. Kalibrační křivka pro ABZ v mobilní fázi, která má složení pufr:ACN=70:30 | 26 |
| 4.2.1.2. Kalibrační křivka 10x zředěného ABZ v mobilní fázi, která má složení pufr:ACN=70:30 | 28 |
| 4.2.1.3. Kalibrační křivka 100x zředěného ABZ v mobilní fázi, která má složení pufr:ACN=70:30 | 30 |
| 4.2.1.4. Kalibrační křivka pro ABZSO ₂ v mobilní fázi, která má složení pufr:ACN=70:30 | 32 |
| 4.2.1.5. Kalibrační křivka 10x zředěného ABZSO ₂ v mobilní fázi, která má složení pufr:ACN=70:30 | 34 |
| 4.2.1.6. Kalibrační křivka 100x zředěného ABZSO ₂ v mobilní fázi, která má složení pufr:ACN=70:30 | 36 |
| 4.2.1.7. Kalibrační křivka pro ABZSO v mobilní fázi, která má složení pufr:ACN=70:30 | 38 |

| | |
|---|----|
| 4.2.1.8. Kalibrační křivka 10x zředěného ABZSO v mobilní fázi, která má složení pufr:ACN=70:30 | 40 |
| 4.2.1.9. Kalibrační křivka 100x zředěného ABZSO v mobilní fázi, která má složení pufr:ACN=70:30 | 42 |
| 4.2.2. Kalibrační křivky ABZ, ABZSO a ABZSO ₂ , použitá mobilní fáze měla složení H ₂ O:ACN=70:30 | 44 |
| 4.2.2.1. Kalibrační křivka pro ABZ v mobilní fázi, která má složení H ₂ O:ACN=70:30..... | 45 |
| 4.2.2.2. Kalibrační křivka 10x zředěného ABZ v mobilní fázi, která má složení H ₂ O:ACN=70:30..... | 47 |
| 4.2.2.3. Kalibrační křivka 100x zředěného ABZ v mobilní fázi, která má složení H ₂ O:ACN=70:30..... | 49 |
| 4.2.2.4. Kalibrační křivka pro ABZSO ₂ v mobilní fázi, která má složení H ₂ O:ACN=70:30..... | 51 |
| 4.2.2.5. Kalibrační křivka 10x zředěného ABZSO ₂ v mobilní fázi, která má složení H ₂ O:ACN=70:30..... | 53 |
| 4.2.2.6. Kalibrační křivka 100x zředěného ABZSO ₂ v mobilní fázi, která má složení H ₂ O:ACN=70:30..... | 55 |
| 4.2.2.7. Kalibrační křivka pro ABZSO v mobilní fázi, která má složení H ₂ O:ACN=70:30..... | 57 |
| 4.2.2.8. Kalibrační křivka 10x zředěného ABZSO v mobilní fázi, která má složení H ₂ O:ACN=70:30..... | 59 |
| 4.2.2.9. Kalibrační křivka 100x zředěného ABZSO v mobilní fázi, která má složení H ₂ O:ACN=70:30..... | 61 |
| 4.3. Slepý vzorek | 63 |
| 4.4. Stanovení opakovatelnosti retenčních časů a ploch píků..... | 64 |
| 5. DISKUZE | 68 |
| 6. ZÁVĚR..... | 71 |
| Použitá literatura a zdroje | 73 |

Souhrn

V práci je studována HPLC analýza albendazolu a jeho metabolitů za použití core-shell kolony Ascentis[®] Express RP-Amide.

V první části experimentu bylo hledáno vhodné složení mobilní fáze. Byly nalezeny dvě mobilní fáze o různých složeních, při kterých separace albendazolu a jeho metabolitů probíhá výborně.

V druhé části práce byla testována linearita odezvy diode-array detektoru v širokém koncentračním rozmezí benzimidazolů pro obě nalezené mobilní fáze. Z naměřených hodnot byly sestrojeny kalibrační křivky pro albedazol, albendazol sulfoxid a albendazol sulfon.

Abstract

The HPLC analysis of albendazole and its metabolites using the core-shell column Ascentis[®] Express RP-Amide is studied in the thesis.

A suitable composition of the mobile phase was searched in the first part of the experiment. Two mobile phases of different composition, enabling an excellent separation of albendazole and its metabolites, were found.

The linearity of the diode-array detector response in a wide concentration range of the benzimidazoles for both found mobile phases were tested in the second part. Calibration curves for albendazole, albendazole sulphone, and albendazole sulfoxide were constructed using the measured values.

1.ÚVOD

Albendazol náleží do skupiny benzimidazolových anthelmintik. Látky z této skupiny jsou využívány pro veterinární i humánní účely. Pro analýzu těchto látek je často potřeba hledat vhodnou analytickou metodu, která zároveň musí být velmi citlivá, protože jejich rezidua a metabolity mohou zůstat v organismu ve velmi nízkých koncentracích. Z tohoto důvodu se pro analýzu benzimidazolů často využívá právě vysokoúčinná kapalinová chromatografie.

Tato diplomová práce si kladla za cíl najít vhodné složení mobilní fáze pro HPLC separaci albendazolu a jeho metabolitů (albendazol sulfon a albendazol sulfoxid) za použití core-shell kolony Ascentis® Express RP-Amide. Jako vnitřní standard byl během experimentu používán oxibendazol.

V druhé části experimentu je studována linearita odezvy diode-array detektoru v širokém koncentračním rozmezí. Na základě naměřených hodnot jsou následně sestaveny kalibrační křivky pro albendazol a jeho dva metabolity.

2.TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Farmaceutické využití benzimidazolů

Albendazol náleží do skupiny benzimidazolových anthelmintik, která je nejpočetnější skupinou anthelmintik odvozenou od jedné chemické struktury. Část léčivých látek z této skupiny patří k anthelmintikům s nejširším spektrem účinku. Léčiva z této skupiny mají antinematodní, antitrepatodní a anticestodní účinky. Lze je také použít k terapii giardiózy ¹⁾.

Primárním mechanismem účinku benzimidazolů je inhibice energetického metabolismu helmintů. Benzimidazoly inhibují syntézu β -tubulinových subjednotek, které jsou nutné pro tvorbu mikrotubulů v buňkách parazitů. Narušují tím transport a metabolismus glukózy, čímž dochází k energetickému vyčerpání parazita, k ztrátě jeho pohyblivosti a k odumření. Benzimidazoly mají mnohonásobně vyšší afinitu k parazitárnímu β -tubulinu než k β -tubulinu ošetřovaných zvířat, proto je jejich podání bezpečné i při mírném překročení terapeutické dávky. Většina léčivých látek z této skupiny působí na parazitujícího červa ve všech jeho vývojových stádiích ¹⁾. Řada studií ukázala, že dalším mechanismem účinku benzimidazolů je inhibice enzymu fumarát reduktázy v parazitech a blokáce vzniku kyseliny jantarové. Důsledkem je narušení cyklu dikarboxylových kyselin, který nahrazuje Krebsův cyklus u anaerobních parazitů. Cyklus dikarboxylových kyselin začíná vazbou oxidu uhličitého na pyruvát nebo lépe na fosfoenolpyruvát. Vzniká tak oxalacetát. Cyklus probíhá přes malát a fumarát a končí syntézou sukcinátu. Z toho důvodu probíhá cyklus dikarboxylových kyselin v opačném směru než cyklus Krebsův ²⁾.

Poločas účinku závisí na délce přetrvávání terapeutických koncentrací benzimidazolů v tělních tekutinách a tkáních. Jednotlivé benzimidazoly mají různou farmakokinetiku, liší se rozpustností ve vodě a v závislosti na rychlosti absorpce mohou dosahovat různých plazmatických koncentrací. Benzimidazoly, které dosahují rychleji maximálních plazmatických koncentrací, se také rychleji metabolizují a vylučují z těla. Vstřebávání benzimidazolů ze zažívacího traktu ovlivňuje příjem potravy, protože může ovlivnit pH a také přítomnost bakterií střevní mikroflóry. Farmakokinetika benzimidazolů je rozdílná u různých zvířecích druhů. Opakované podání je potřeba u zvířat s jednokomorovým žaludkem. Jednorázové podání lze

aplikovat u zvířat s vícekomorovým žaludkem a u dalších býložravců ³⁾. Při masivní infekci parazity je výhodné, že k odstranění parazitů ze střeva nedochází ihned. Nehrozí tak obstrukce gastrointestinálního traktu shlukem paralyzovaných helmintů. Všechna léčiva odvozená od benzimidazolů jsou nerozpustná, nebo slabě rozpustná ve vodě. Podáním s potravou dosáhneme vyššího absorpčního efektu. Při distribuci benzimidazolů záleží na velikosti molekuly, na schopnosti látky rozpouštět se v tucích a na vazbě látky na bílkoviny v plazmě. Vazba na plazmatické bílkoviny je u většiny benzimidazolů do 50% ^{1), 4)}.

Benzimidazoly se biotransformují na řadu metabolitů. Tyto metabolity mohou mít anthelmintické účinky. Albendazol se metabolizuje na albendazol sulfoxid a albendazol sulfon. U léčených zvířat se rezidua těchto metabolitů nacházejí ve tkáních, ve vejcích a v mléce. Proto je nutné dodržovat ochranné lhůty u zvířat určených k chovu ²⁾.

Monitorování metabolitů je složité. Nelze k tomu použít pouze jednu analytickou metodu, protože existuje řada reziduí těchto metabolitů. Obvykle se pro monitorování volí metabolit, který se nachází v největším množství. Poté se extrahuje ze zkoumané potraviny, tkáně nebo tělní tekutiny, a zvolí se vhodná analytická metoda.

V současnosti se používají především chromatografické metody. Mezi jejich výhody patří automatizace, vysoká citlivost a možnost hodnotit analyzované látky jak kvalitativně, tak kvantitativně. Nejvíce se pro farmakokinetiku reziduí volí metoda LC-MS/MS, která je spojením vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Dále se pro analýzu benzimidazolů a jejich metabolitů používá HPLC s UV nebo fluorescenční detekcí. HPLC je vysoce selektivní metoda sloužící k identifikaci a kvantifikaci jednotlivých složek zkoumané směsi. Metoda je velice citlivá, protože na rozdíl od absorpčních spektrálních metod dokáže metabolity benzimidazolů zjistit i při velmi nízkých koncentracích ²⁾.

2.2. HPLC ve farmaceutické analýze

Mezi nejpoužívanější analytické metody patří v současné době HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie). Tato fyzikálně-chemická instrumentální metoda se používá k separaci jednotlivých komponent ze směsi, k jejich identifikaci a také kvantifikaci. K separaci směsi látek dochází na základě rozdílných interakcí jednotlivých analytů, které jsou rozpuštěné v mobilní fázi, s povrchem stacionární fáze ⁵⁾.

Zkoumaný vzorek se vstřikuje do proudu mobilní fáze. Mobilní fáze je pod vysokým tlakem poháněna do kolony, která obsahuje stacionární fázi o velkém povrchu. Jednotlivé složky vzorku mohou reagovat s mobilní i se stacionární fází. Záleží na síle interakce mezi analytem a fází. Látky, které interagují slaběji se stacionární fází, jsou unášeny mobilní fází a z kolony jsou vymyty dříve. Naopak látky se silnou vazbou na stacionární fázi, se v koloně zdržují déle. K separaci analytů ze zkoumané směsi dochází tehdy, pokud jsou interakce jednotlivých látek různé. Díky tomu se každý analyt z kolony vymyje za jiný časový interval ⁶⁾.

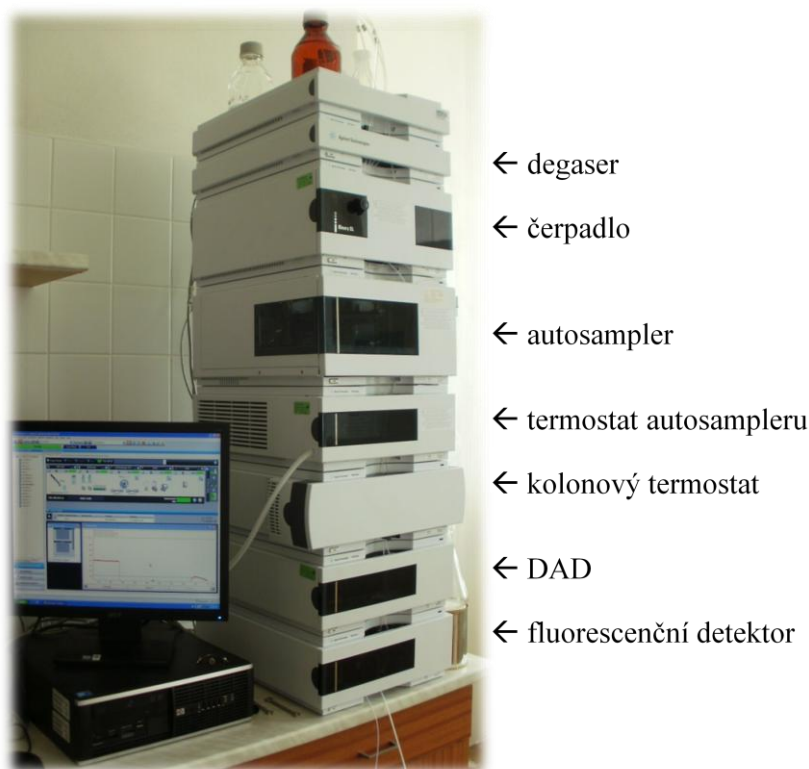
Na rozdíl od běžné kapalinové chromatografie využívá klasická HPLC mnohem vyššího provozního tlaku (do 400 barů). Běžná kapalinová chromatografie využívá pouze gravitační sílu, díky které mobilní fáze proteče kolonou. Typické rozměry HPLC kolony jsou 2,1 až 4,6 mm v průměru a 30 až 250mm na délku, kolona je naplněná částicemi sorbentu o střední velikosti částic 2-50 μm . Díky těmto vlastnostem je HPLC oblíbenou metodou, protože má vynikající rozlišovací schopnost při separaci jednotlivých analytů ze směsí.

HPLC přístroj se obvykle skládá z čerpadla, degaseru, sampleru, kolony a detektoru. Sampler přináší vzorek do proudu mobilní fáze. Díky čerpadlu je mobilní fáze se vzorkem unášena skrz kolonu. Detektor vytváří signál, který je úměrný množství látky vstupující do kolony, a slouží tak ke kvantifikaci analyzovaného vzorku. HPLC přístroj je ovládán díky digitálnímu mikroprocesoru a uživatelskému softwaru. Tato zařízení provádějí sběr, zpracování a analýzu dat. Některé modely čerpadel dokážou směšovat více rozpouštědel a poměr jejich koncentrací měnit v čase a vytvářet tak kompoziční gradient v mobilní fázi. Běžně se využívá několik typů detektorů: UV/VIS, detektor s diodovým polem (PDA), refraktometrický, ELSD (evaporative

light scattering detector), fluorimetrický nebo detekce probíhá na bázi hmotnostní spektrometrie. Většina HPLC přístrojů má také kolonový termostat, kterým lze udržovat konstantní teplotu kolony během analýzy ⁶⁾.

Na obrázku 1 jsou znázorněny jednotlivé části kapalinového chromatografu Agilent® Series 1200 SL (Agilent Technologies).

Obrázek 1: Kapalinový chromatograf Agilent® Series 1200 SL (Agilent Technologies)



HPLC se využívá ve všech fázích vývoje a výroby léčiv, důležité uplatnění nachází i po zavedení léčiva na trh.

Tato metoda se uplatňuje již ve fázi preklinického výzkumu při analyzování potenciálních léčiv. Je hlavní metodou při zjišťování čistoty a stability nově připravených látek. Nachází také uplatnění při vývoji a hodnocení lékových forem. Slouží i při studiu osudu léčiv v organismu ve fázi preklinického i klinického vývoje, protože umožňuje studium farmakokinetiky léčiv. Využívá se ke stanovení

koncentrací potenciálních léčivých látek v různém biologickém materiálu, k identifikaci a kvalitifikaci metabolitů.

HPLC je také hojně aplikována při terapeutickém monitorování léčiv. Pomocí individualizace dávek lze dosáhnout bezpečné a účinné terapie. Dále se HPLC používá také při vývoji generických přípravků například ke studiu bioekvivalence.

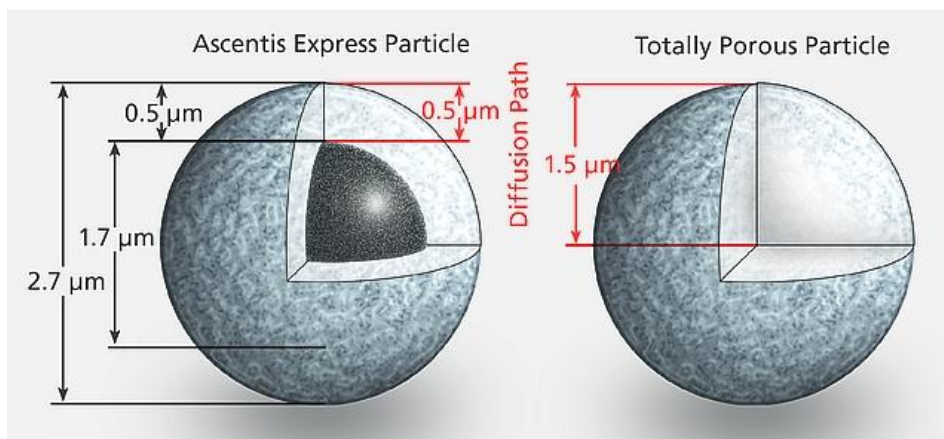
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie hraje důležitou roli při kontrole léčiv a jistění jakostí u výrobců a kontrolních orgánů. Klade důraz na zvyšující se požadavky na účinnost a bezpečnost farmakoterapie. S tím také souvisí stále přísnější dohled státních a mezinárodních institucí ^{5), 6)}.

2.3. HPLC kolona Ascentis® Express RP-Amide

Kolona Ascentis® Express RP-Amide kombinuje stacionární fázi, která obsahuje polární amidoskupiny (EPG) k odstínění povrchu silikagelového nosiče od mobilní fáze, s technologií povrchově porézních částic⁸⁾.

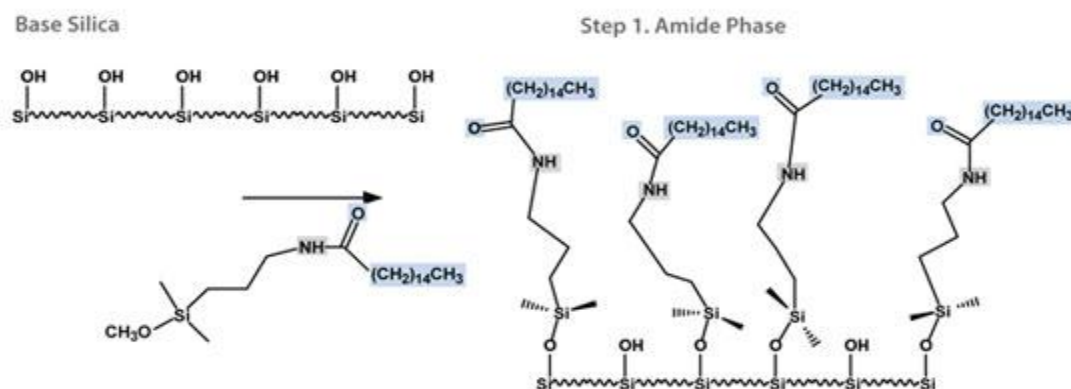
Povrchově porézní částice Ascentis Express je znázorněna na obrázku 2. Částice je tvořena pevným neporézním jádrem, které má průměr 1,7 μm , a porézním pláštěm o tloušťce 0,5 μm . Struktura částice pozitivně ovlivňuje rychlost analýzy a rozlišení píků.

Obrázek 2: Částice Ascentis Express⁷⁾:



Fáze Ascentis® Express RP-Amide jsou vyráběny v jediném kroku syntézy, kdy je amid zaváděn jako celá jednotka, čímž se eliminuje výskyt volných aminů. Takto vyrobená stacionární fáze zvyšuje selektivitu, stabilitu vůči vodě a zlepšuje tvar píků bazických látek. Schéma syntézy je na obrázku 3. Ascentis® Express RP-Amide fáze významně omezuje silanolové interakce s bazickými analyty a zlepšuje tak tvar jejich píků. Je také selektivnější k polárním látkám a to zejména k těm, které se mohou chovat jako donory vodíkových vazeb⁸⁾.

Obrázek 3: Schéma reakce zavedení amidoskupiny do stacionární fáze ⁸⁾:



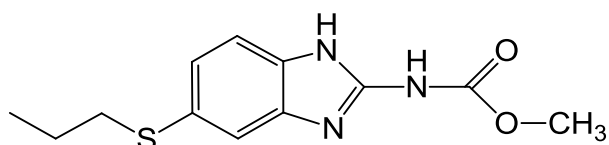
Vzhledem k rozdílné selektivitě RP-Amidu a C18, mohou být separovány i analyty, které při použití C18 koeluují ⁹⁾.

3.PRAKTICKÁ ČÁST

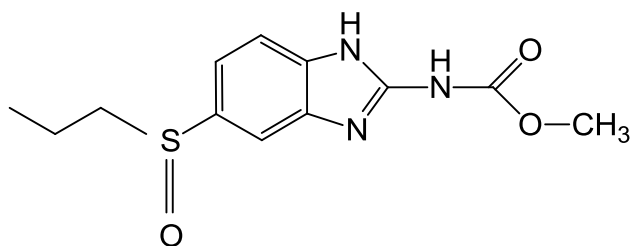
3.1. Chemikálie

3.1.1. Sledovaná léčiva

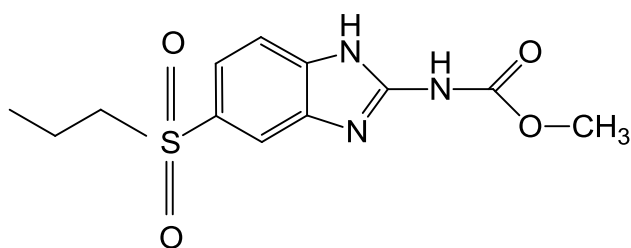
Albendazol (ABZ) – Sigma



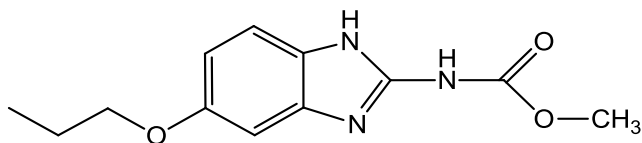
Albendazol sulfoxid (ABZSO) – Toronto Research Chemicals



Albendazol sulfon (ABZSO₂) - Toronto Research Chemicals



Oxibendazol (OXI) - Sigma



3.1.2. Další chemikálie

Dimethylsulfoxid p. a. (DMSO) - Fluka

Methanol (CH₃OH) – Chromasolv® gradient grade for HPLC - Aldrich

Deionizovaná voda připravená reverzní osmózou – FaF UK

Acetonitril (ACN) - Chromasolv® gradient grade for HPLC - Aldrich

Kyselina octová 99 % p. a. (CH₃COOH) – Lach-Ner Neratovice

Kyselina fosforečná 85 % p. a. (H₃PO₄) – Lachema Brno

Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát p. a. (Na₂HPO₄·12 H₂O) - Penta

3.2. Použité roztoky

Acetonitrilové roztoky ABZ, ABZSO, ABZSO₂, OXI

Fosfátový pufr o pH = 7,0 (0,015 mol/l)

Roztok kyseliny octové 0,1 mol/l

Kalibrační pufr TEP o pH = 4,01 a pH = 7,00 (WTW)

3.2.1. Příprava acetonitrilových zásobních roztoků ABZ, ABZSO, ABZSO₂, OXI

Navážila jsem 13,333 mg ABZ, 13,363 mg ABZSO, 6,690 mg ABZSO₂ a 13,336 mg OXI. Navážená množství zkoumaných látek jsem rozpustila v DMSO, tak aby se právě rozpustila. Roztoky jsem kvantitativně převedla do 25 ml odměrné baňky a doplnila mobilní fází ACN/fosfátový pufr (0,015 mol/l, pH=7,0) = 30:70. Roztoky nižší koncentrace byly dále připravovány příslušným ředěním.

3.2.2. Příprava fosfátového pufru 0,015 mol/l, pH=7,0

Navážila jsem 5,37 g hydrogenfosforečnanu sodného dodekahydrátu a rozpustila ho v cca 980 ml deionizované vody. Pomocí pH-metru jsem upravila pH tohoto roztoku na hodnotu 7,0 kyselinou fosforečnou a doplnila jej v odměrné baňce na 1000 ml. Takto připravený roztok jsem přefiltrovala přes nylonový filtr (Nylon 66 0.45 µm firmy Supelco) na filtračním zařízení Supelco. Roztok pufru bylo třeba denně připravovat čerstvý.

3.2.3. Příprava roztoku kyseliny octové 0,1 mol/l

K cca 990 ml neionizované vody v odměrné baňce jsem napipetovala 5,781 ml 99% kyseliny octové. V odměrné baňce jsem roztok doplnila na 1000 ml a protřepala.

3.3. Použité přístroje

Kapalinový chromatograf Agilent® Series 1200 SL (Agilent Technologies)

- vakuový mikrodegaser
- binární čerpadlo 1200 SL
- autosampler 1200 SL plus
- termostat autosampleru
- kolonový termostat TCC Infinity 1290
- kolona Ascentis® Express RP-Amide (výrobce Sigma-Aldrich®, délka 10cm, průměr 3,0 mm, fáze Ascentis® Express RP-Amide, velikost částic 2,7µm)
- detektor s diodovým polem 1200 SL
- fluorescenční detektor 1200.

Chromatografický systém byl řízen programem AgilentChemStation, verze B. 04.02.

pHmetr inoLab 720 (WTW) s kombinovanou pH elektrodou Theta typ 103

Digitální analytické váhy (Satorius)

3.4. Podmínky měření

CH_3COOH (0,1mol/l)

fosfátový pufr (dále jen pufr) pH=7,0 (0,015mol/l)

ACN

průtok 0,7 ml/min

nástřik 10 μl

$\lambda=270\text{nm}$

4.VÝSLEDKY

4.1. Složení mobilní fáze a zjištěné retenční časy ABZ, ABZSO, ABZSO₂ a OXI

V první části měření jsem zjišťovala vhodné složení mobilní fáze. Kombinovala jsem rozpouštědla v různých poměrech a zkoumala jsem, při kterých kombinacích vycházejí jednotlivé retenční časy zkoumaných benzimidazolů nejlépe (jednotlivé píky se nepřekrývají a retenční čas není delší než 10 min).

Naměřené retenční časy zkoumaných látek (ABZ, ABZSO, ABZSO₂, OXI) pro různá složení mobilní fáze jsou uvedeny v minutách v tabulkách 1 – 6.

Tabulka 1: Retenční časy zkoumaných látek v závislosti na poměru složek v mobilní fázi (MF) pufr/acetonitril:

| MF | pufr:ACN | | |
|--------------------------|--------------|--------------|--------------|
| poměr | 80:20 | 70:30 | 75:25 |
| ABZ | 35,747 | 7,040 | 14,805 |
| ABZSO | 1,784 | 0,744 | 1,128 |
| ABZSO₂ | 3,526 | 1,356 | 2,001 |
| OXI | 11,664 | 3,115 | 5,586 |

Tabulka 2: Retenční časy zkoumaných látek v závislosti na poměru složek v mobilní fázi (MF) kyselina octová/acetonitril:

| MF | CH ₃ COOH:ACN | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------|--------------|
| poměr | 70:30 | 80:20 | 60:40 |
| ABZ | 4,371 | 0,678 | 1,870 |
| ABZSO | 0,737 | 1,571 | 0,640 |
| ABZSO₂ | 1,316 | 3,347 | 0,848 |
| OXI | 1,421 | 3,439 | 0,931 |

Tabulka 3: Retenční časy zkoumaných látek v závislosti na poměru složek v mobilní fázi (MF) voda/acetonitril:

| MF | H₂O:ACN | | | |
|--------------------------|---------------------------|--------------|--------------|--------------|
| poměr | 80:20 | 60:40 | 68:32 | 70:30 |
| ABZ | 36,088 | 2,487 | 5,505 | 6,940 |
| ABZSO | 1,814 | 0,660 | 0,744 | 0,763 |
| ABZSO₂ | 3,529 | 0,865 | 1,198 | 1,341 |
| OXI | 11,700 | 1,470 | 2,603 | 3,800 |

Tabulka 4: Retenční časy zkoumaných látek v závislosti na poměru složek v mobilní fázi (MF) pufr/methanol:

| MF | pufr:MeOH | |
|--------------------------|------------------|--------------|
| poměr | 50:50 | 60:40 |
| ABZ | 6,954 | 21,417 |
| ABZSO | 1,089 | 1,835 |
| ABZSO₂ | 1,198 | 2,169 |
| OXI | 3,246 | 8,116 |

Zkoušela jsem také mobilní fázi o složení pufr/MeOH=75:25, ale analýza nebyla dokončena, protože pík analytu s nejkratším retenčním časem (ABZSO) se neobjevil ani po 45. minutě.

Tabulka 5: Retenční časy zkoumaných látek v závislosti na poměru složek v mobilní fázi (MF) kyselina octová/methanol:

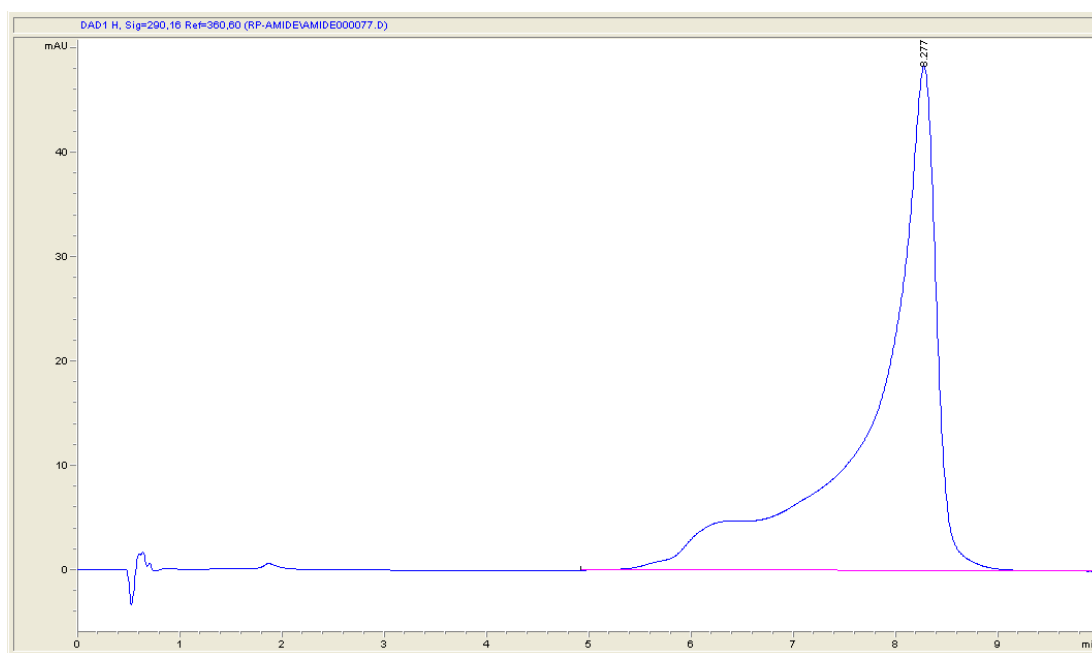
| MF | CH₃COOH:MeOH | |
|--------------------------|--------------------------------|--------------|
| poměr | 60:40 | 70:30 |
| ABZ | 12,245 | 31,518 |
| ABZSO | 1,705 | 3,607 |
| ABZSO₂ | 2,148 | 5,121 |
| OXI | 3,150 | 6,499 |

Tabulka 6: Retenční časy zkoumaných látek v závislosti na poměru složek v mobilní fázi (MF) voda/methanol:

| MF | H ₂ O:MeOH | |
|--------------------------|-----------------------|-------|
| | 60:40 | 40:60 |
| ABZ | 21,798 | 2,865 |
| ABZSO | 1,823 | 0,834 |
| ABZSO₂ | 2,199 | 0,873 |
| OXI | 8,277 | 1,690 |

Na obrázku 4 je chromatogram OXI. Mobilní fáze měla během analýzy složení H₂O:MeOH = 60:40.

Obrázek 4: Chromatogram OXI:



Zkoušela jsem také mobilní fázi, která obsahovala pouze vodu. Analýza nebyla dokončena, protože pík analytu s nejkratším retenčním časem (ABZSO) se neobjevil ani po 45. minutě.

Z tabulek 1-6 vyplynuly nejvhodnější mobilní fáze pro další měření, a to:

H₂O:ACN=70:30

Pufr:ACN=70:30

4.2. Kalibrační křivky ABZ, ABZSO a ABZSO₂

V druhé části práce jsem měla za úkol sestavit kalibrační křivky ABZ, ABZSO a ABZSO₂ pro mobilní fáze, které vyplynuly z prvního měření jako nejvhodnější. Nejdříve jsem pracovala s mobilní fází, která měla složení pufr:ACN=70:30. Do vialek jsem si připravila 4 základní roztoky o různých koncentracích, které obsahovaly všechny zkoumané látky. Do dalších vialek jsem jednotlivé základní roztoky zředila 10x a 100x. Poté jsem provedla měření a sestavila kalibrační křivky ABZ, ABZSO a ABZSO₂. OXI byl použit jako vnitřní standard. V příslušných grafech představují souřadnice na ose x poměry ploch píků zkoumané látky ku vnitřnímu standardu. Souřadnicemi na ose y jsou poměry koncentrací zkoumané látky ku vnitřnímu standardu. Vzniklými body grafu jsem proložila přímkou.

Pro každou kalibrační křivku jsou dále v tabulkách uvedeny koncentrace analyzovaných látek, plochy příslušných píků a vypočítané poměry koncentrací zkoumané látky ku vnitřnímu standardu a poměry ploch zkoumané látky ku vnitřnímu standardu.

Celý postup jsem zopakovala pro mobilní fázi H₂O:ACN=70:30.

4.2.1. Kalibrační křivky ABZ, ABZSO a ABZSO₂, použitá mobilní fáze měla složení pufr:ACN=70:30

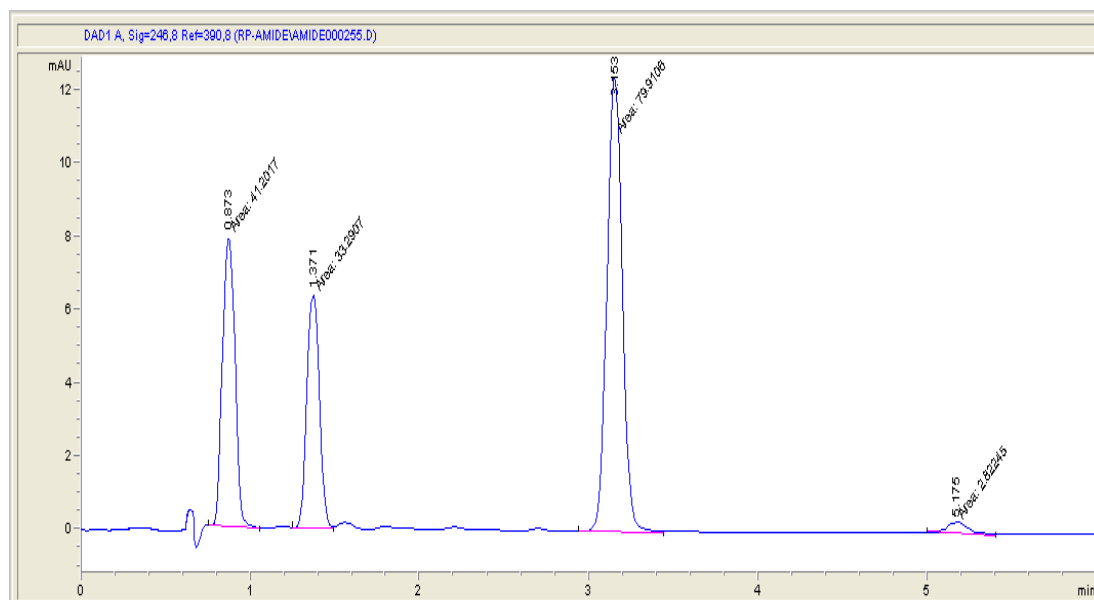
Složení základních roztoků (1K, 2K, 3K, 4K) je popsáno v tabulce 7. V tabulce jsou uvedeny jednotlivé koncentrace (c) zkoumaných látek.

Tabulka 7: Složení základních roztoků (1K, 2K, 3K, 4K):

| | c (ABZSO) μmol/l | c (ABZSO ₂) μmol/l | c (ABZ) μmol/l | c (OXI) μmol/l |
|-----------|---------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------|
| 1K | 4,22 | 2,00 | 4,47 | 7,13 |
| 2K | 3,17 | 1,50 | 3,35 | 7,13 |
| 3K | 2,11 | 1,00 | 2,23 | 7,13 |
| 4K | 1,06 | 0,50 | 1,12 | 7,13 |

Na obrázku 5 je chromatogram základního roztoku 1K. Použitá mobilní fáze měla složení pufr:ACN=70:30.

Obrázek 5: Chromatogram základního roztoku 1K:



4.2.1.1. Kalibrační křivka pro ABZ v mobilní fázi, která má složení pufr:ACN=70:30

V tabulce 8 jsou uvedeny koncentrace ABZ a OXI v jednotlivých základních roztocích a naměřené hodnoty ploch příslušných píků. Poměry ploch píků ABZ/OXI a poměry koncentrací ABZ/OXI jsou uvedeny v tabulce 9. Kalibrační křivka ABZ je v grafu 1.

Tabulka 8: Koncentrace ABZ a OXI v základních roztocích a naměřené hodnoty příslušných ploch píků:

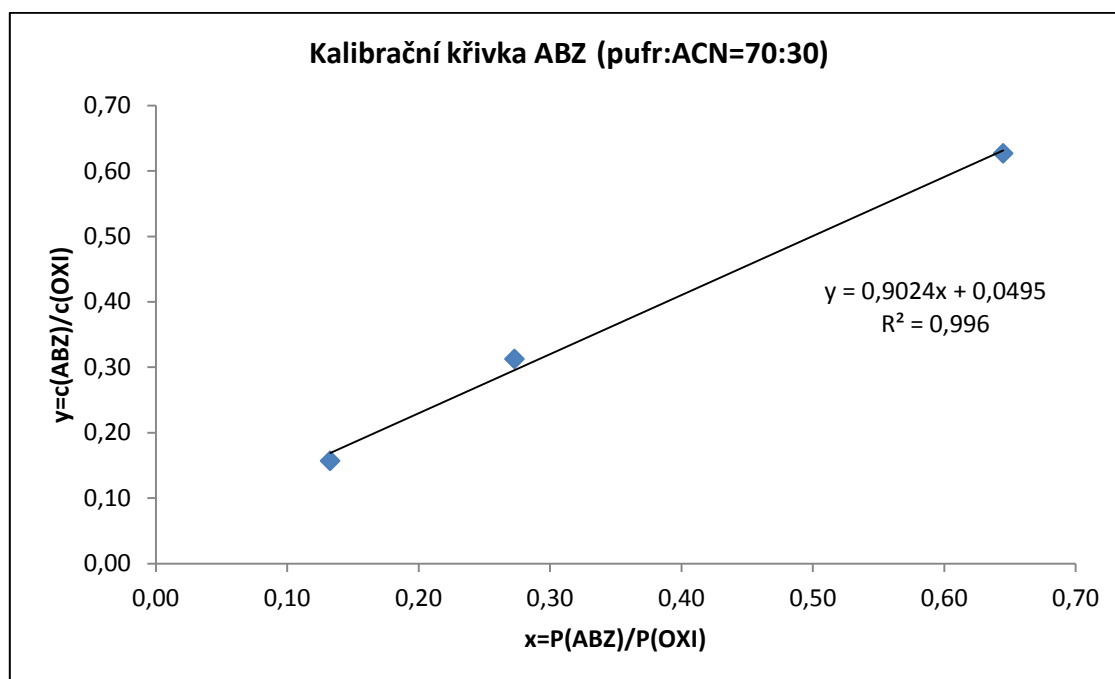
| | c(ABZ) $\mu\text{mol/l}$ | P(ABZ) | c(OXI) $\mu\text{mol/l}$ | P(OXI) |
|-----------|--------------------------|--------|--------------------------|--------|
| 1K | 4,47 | 48,28 | 7,13 | 74,86 |
| 2K | 3,35 | 43,98 | 7,13 | 74,96 |
| 3K | 2,23 | 21,67 | 7,13 | 79,37 |
| 4K | 1,12 | 10,37 | 7,13 | 78,12 |

Plochy píků jsou v této i v následujících tabulkách uvedeny v mAU·min.

Tabulka 9: Poměry ploch píků ABZ/OXI (x) a poměry koncentrací ABZ/OXI (y) pro základní roztoky:

| | $x=P(\text{ABZ})/P(\text{OXI})$ | $y=c(\text{ABZ})/c(\text{OXI})$ |
|-----------|---------------------------------|---------------------------------|
| 1K | 0,64 | 0,63 |
| 2K | 0,59 | 0,47 |
| 3K | 0,27 | 0,31 |
| 4K | 0,13 | 0,16 |

Graf 1: Kalibrační křivka ABZ:



4.2.1.2. Kalibrační křivka 10x zředěného ABZ v mobilní fázi, která má složení pufr:ACN=70:30

V tabulce 10 jsou uvedeny koncentrace ABZ a OXI 10x zředěných roztoků a naměřené plochy příslušných píků. Poměry ploch píků ABZ/OXI a poměry koncentrací ABZ/OXI uvádí tabulka 11. Kalibrační křivka 10x zředěného ABZ je v grafu 2.

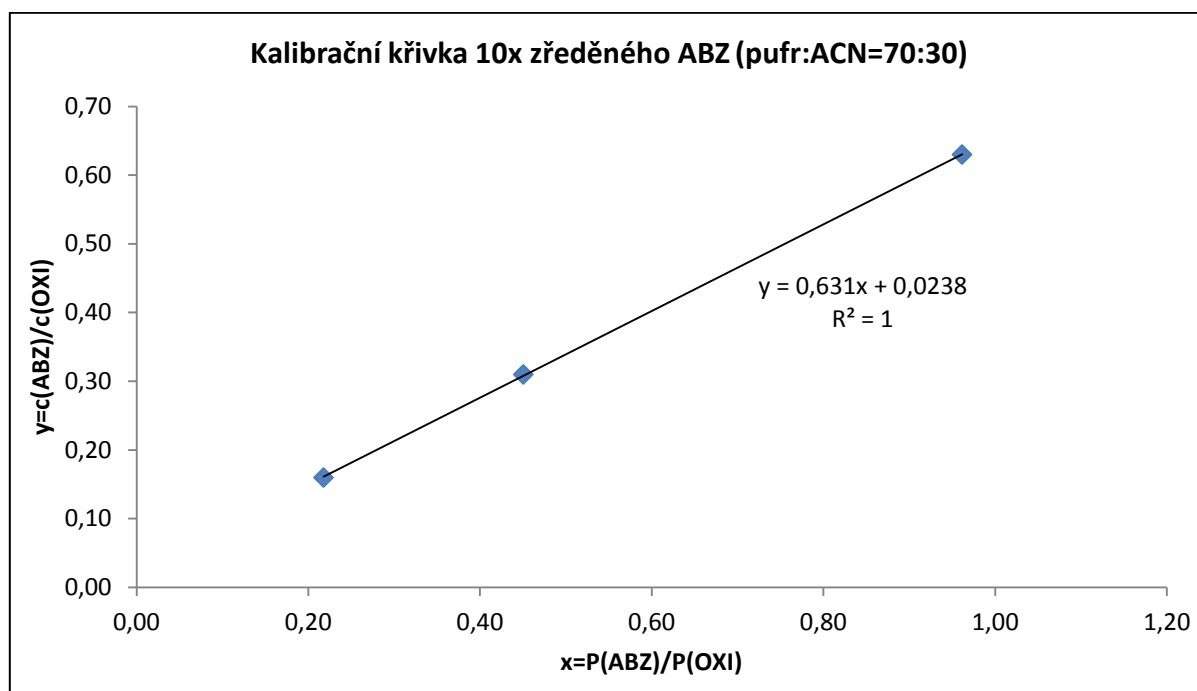
Tabulka 10: Koncentrace ABZ a OXI a naměřené hodnoty příslušných ploch píků pro 10x zředěné roztoky:

| | c(ABZ) $\mu\text{mol/l}$ | P(ABZ) | c(OXI) $\mu\text{mol/l}$ | P(OXI) |
|-----------|--------------------------|--------|--------------------------|--------|
| 1Z | $4,47 \cdot 10^{-1}$ | 127,26 | $7,13 \cdot 10^{-1}$ | 132,34 |
| 2Z | $3,35 \cdot 10^{-1}$ | 114,22 | $7,13 \cdot 10^{-1}$ | 129,04 |
| 3Z | $2,23 \cdot 10^{-1}$ | 30,28 | $7,13 \cdot 10^{-1}$ | 67,20 |
| 4Z | $1,12 \cdot 10^{-1}$ | 30,22 | $7,13 \cdot 10^{-1}$ | 138,69 |

Tabulka 11: Poměry ploch píků ABZ/OXI (x) a poměry koncentrací ABZ/OXI (y) pro 10x zředěné roztoky:

| | $x = P(\text{ABZ})/P(\text{OXI})$ | $y = c(\text{ABZ})/c(\text{OXI})$ |
|-----------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1Z | 0,96 | 0,63 |
| 2Z | 0,89 | 0,47 |
| 3Z | 0,45 | 0,31 |
| 4Z | 0,22 | 0,16 |

Graf 2: Kalibrační křivka 10x zředěného ABZ:



4.2.1.3. Kalibrační křivka 100x zředěného ABZ v mobilní fázi, která má složení pufr:ACN=70:30

V tabulce 12 jsou uvedeny koncentrace ABZ a OXI 100x zředěných kalibračních roztoků a naměřené plochy příslušných píků. Poměry ploch píků ABZ/OXI a poměry koncentrací ABZ/OXI uvádí tabulka 13. Kalibrační křivka 100x zředěného ABZ je v grafu 3.

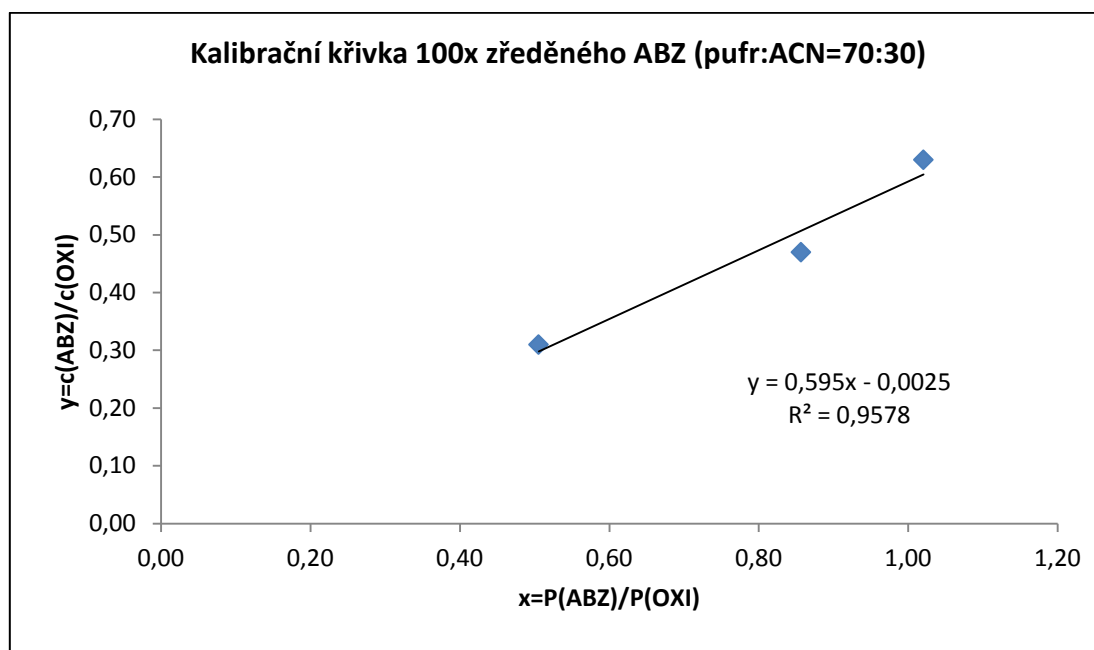
Tabulka 12: Koncentrace ABZ a OXI a naměřené hodnoty příslušných ploch píků pro 100x zředěné roztoky:

| | c(ABZ) $\mu\text{mol/l}$ | P(ABZ) | c(OXI) $\mu\text{mol/l}$ | P(OXI) |
|------------|--------------------------|--------|--------------------------|--------|
| 1ZZ | $4,47 \cdot 10^{-2}$ | 12,97 | $7,13 \cdot 10^{-2}$ | 12,71 |
| 2ZZ | $3,35 \cdot 10^{-2}$ | 11,17 | $7,13 \cdot 10^{-2}$ | 13,04 |
| 3ZZ | $2,23 \cdot 10^{-2}$ | 7,09 | $7,13 \cdot 10^{-2}$ | 14,03 |
| 4ZZ | $1,12 \cdot 10^{-2}$ | 7,88 | $7,13 \cdot 10^{-2}$ | 14,23 |

Tabulka 13: Poměry ploch píků ABZ/OXI (x) a poměry koncentrací ABZ/OXI (y) pro 100x zředěné roztoky:

| | $x = P(\text{ABZ})/P(\text{OXI})$ | $y = c(\text{ABZ})/c(\text{OXI})$ |
|------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1ZZ | 1,02 | 0,63 |
| 2ZZ | 0,86 | 0,47 |
| 3ZZ | 0,51 | 0,31 |
| 4ZZ | 0,55 | 0,16 |

Graf 3: Kalibrační křivka 100x zředěného ABZ:



4.2.1.4. Kalibrační křivka pro ABZSO₂ v mobilní fázi, která má složení pufr:ACN=70:30

V tabulce 14 jsou uvedeny koncentrace ABZSO₂ a OXI v jednotlivých základních roztocích a naměřené hodnoty příslušných píků. Poměry ploch píků ABZSO₂/OXI a poměry koncentrací ABZSO₂/OXI jsou uvedeny v tabulce 15. Kalibrační křivka ABZSO₂ je v grafu 4.

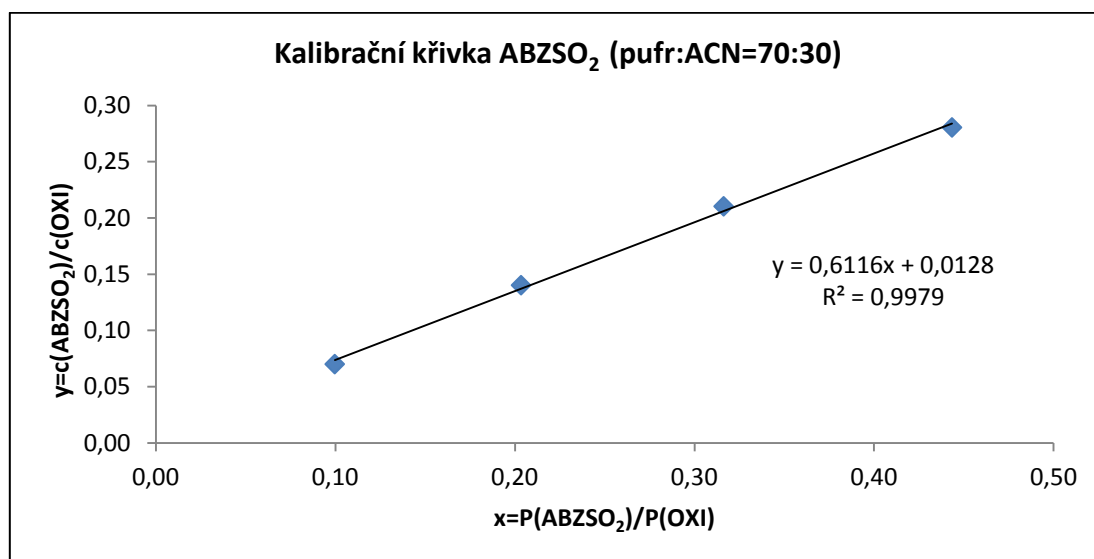
Tabulka 14: Koncentrace ABZSO₂ a OXI v základních roztocích a naměřené hodnoty příslušných ploch píků:

| | c(ABZSO ₂) μmol/l | P(ABZSO ₂) | c(OXI) μmol/l | P(OXI) |
|-----------|-------------------------------|------------------------|---------------|--------|
| 1K | 2,00 | 33,20 | 7,13 | 74,86 |
| 2K | 1,50 | 23,71 | 7,13 | 74,96 |
| 3K | 1,00 | 16,15 | 7,13 | 79,37 |
| 4K | 0,50 | 7,79 | 7,13 | 78,12 |

Tabulka 15: Poměry ploch píků ABZSO₂/OXI (x) a poměry koncentrací ABZSO₂/OXI (y) pro základní roztoky:

| | x=P(ABZSO ₂)/P(OXI) | y=c(ABZSO ₂)/c(OXI) |
|-----------|---------------------------------|---------------------------------|
| 1K | 0,44 | 0,28 |
| 2K | 0,32 | 0,21 |
| 3K | 0,20 | 0,14 |
| 4K | 0,10 | 0,07 |

Graf 4: Kalibrační křivka ABZSO₂:



4.2.1.5. Kalibrační křivka 10x zředěného ABZSO₂ v mobilní fázi, která má složení pufr:ACN=70:30

V tabulce 16 jsou uvedeny koncentrace ABZSO₂ a OXI 10x zředěných roztoků a naměřené plochy příslušných píků. Poměry ploch ABZSO₂/OXI a poměry koncentrací ABZSO₂/OXI uvádí tabulka 17. Kalibrační křivka 10x zředěného ABZSO₂ je v grafu 5.

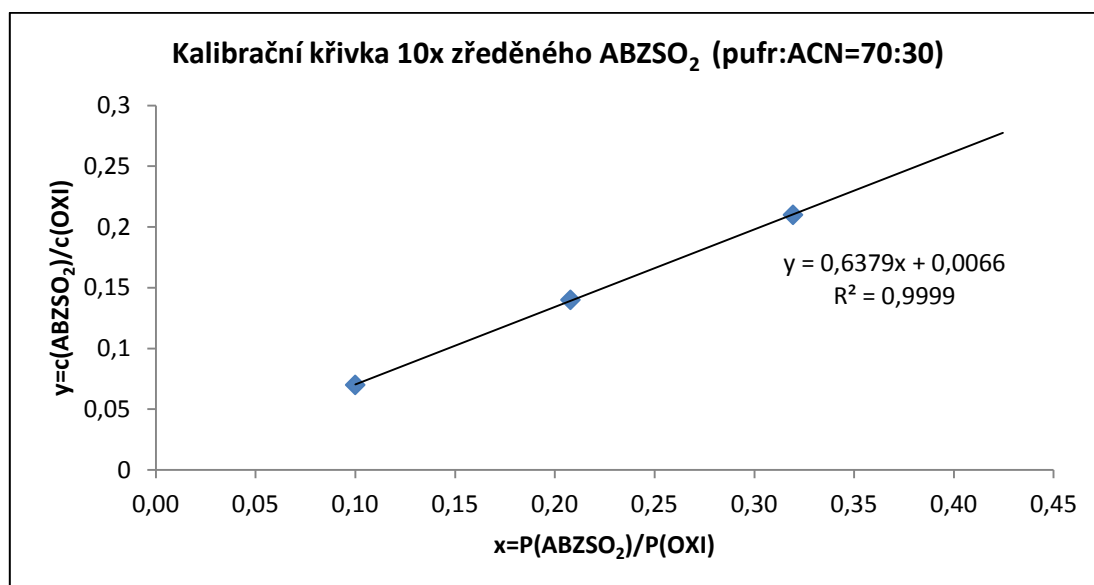
Tabulka 16: Koncentrace ABZSO₂ a OXI a naměřené hodnoty příslušných ploch píků pro 10x zředěné roztoky:

| | c(ABZSO ₂) μmol/l | P(ABZSO ₂) | c(OXI) μmol/l | P(OXI) |
|-----------|-------------------------------|------------------------|-----------------------|--------|
| 1Z | 2,00*10 ⁻¹ | 3,10 | 7,13*10 ⁻¹ | 7,30 |
| 2Z | 1,50*10 ⁻¹ | 2,30 | 7,13*10 ⁻¹ | 7,20 |
| 3Z | 1,00*10 ⁻¹ | 0,79 | 7,13*10 ⁻¹ | 3,80 |
| 4Z | 0,50*10 ⁻¹ | 0,76 | 7,13*10 ⁻¹ | 7,60 |

Tabulka 17: Poměry ploch píků ABZSO₂/OXI (x) a poměry koncentrací ABZSO₂/OXI (y) pro 10x zředěné roztoky:

| | x=P(ABZSO ₂)/P(OXI) | y=c(ABZSO ₂)/c(OXI) |
|-----------|---------------------------------|---------------------------------|
| 1Z | 0,42 | 0,28 |
| 2Z | 0,32 | 0,21 |
| 3Z | 0,21 | 0,14 |
| 4Z | 0,10 | 0,07 |

Graf 5: Kalibrační křivka 10x zředěného ABZSO₂:



4.2.1.6. Kalibrační křivka 100x zředěného ABZSO₂ v mobilní fázi, která má složení pufr:ACN=70:30

V tabulce 18 jsou uvedeny koncentrace ABZSO₂ a OXI 100x zředěných kalibračních roztoků a naměřené plochy příslušných píků. Poměry ploch ABZSO₂/OXI a poměry koncentrací ABZSO₂/OXI uvádí tabulka 19. Kalibrační křivka 100x zředěného ABZSO₂ je v grafu 6.

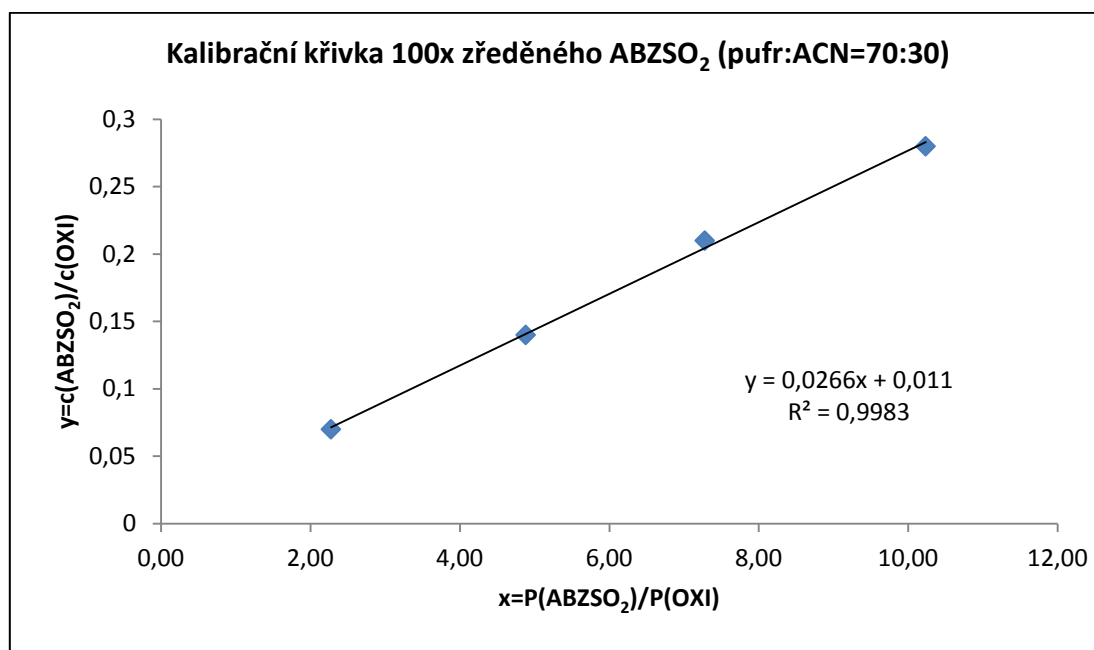
Tabulka 18: Koncentrace ABZSO₂ a OXI a naměřené hodnoty příslušných ploch píků pro 100x zředěné roztoky:

| | c(ABZSO ₂) μmol/l | P(ABZSO ₂) | c(OXI) μmol/l | P(OXI) |
|------------|-------------------------------|------------------------|-----------------------|--------|
| 1ZZ | 2,00*10 ⁻² | 130,08 | 7,13*10 ⁻² | 12,71 |
| 2ZZ | 1,50*10 ⁻² | 94,91 | 7,13*10 ⁻² | 13,04 |
| 3ZZ | 1,00*10 ⁻² | 68,49 | 7,13*10 ⁻² | 14,03 |
| 4ZZ | 0,50*10 ⁻² | 32,37 | 7,13*10 ⁻² | 14,23 |

Tabulka 19: Poměry ploch píků ABZSO₂/OXI (x) a poměry koncentrací ABZSO₂/OXI (y) pro 100x zředěné roztoky:

| | x=P(ABZSO ₂)/P(OXI) | y=c(ABZSO ₂)/c(OXI) |
|------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 1ZZ | 10,23 | 0,28 |
| 2ZZ | 7,28 | 0,21 |
| 3ZZ | 4,88 | 0,14 |
| 4ZZ | 2,27 | 0,07 |

Graf 6: Kalibrační křivka 100x zředěného ABZSO₂:



4.2.1.7. Kalibrační křivka pro ABZSO v mobilní fázi, která má složení pufr:ACN=70:30

V tabulce 20 jsou uvedeny koncentrace ABZSO a OXI v jednotlivých základních roztocích a naměřené hodnoty příslušných píků. Poměry ploch píků ABZSO/OXI a poměry koncentrací ABZSO/OXI jsou uvedeny v tabulce 21. Kalibrační křivka ABZSO je v grafu 7.

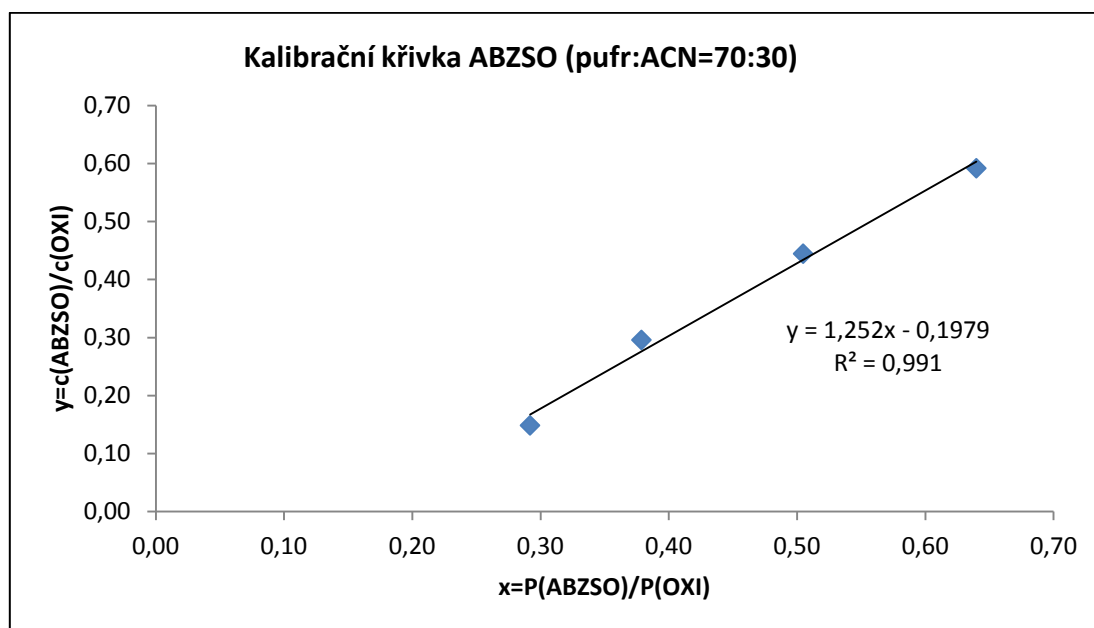
Tabulka 20: Koncentrace ABZSO a OXI v základních roztocích a naměřené hodnoty příslušných ploch píků:

| | c(ABZSO) $\mu\text{mol/l}$ | P(ABZSO) | c(OXI) $\mu\text{mol/l}$ | P(OXI) |
|-----------|----------------------------|----------|--------------------------|--------|
| 1K | 4,22 | 47,90 | 7,13 | 74,86 |
| 2K | 3,17 | 37,84 | 7,13 | 74,96 |
| 3K | 2,11 | 30,06 | 7,13 | 79,37 |
| 4K | 1,06 | 22,80 | 7,13 | 78,12 |

Tabulka 21: Poměry ploch píků ABZSO/OXI (x) a poměry koncentrací ABZSO/OXI (y) pro základní roztoky:

| | $x = P(\text{ABZSO})/P(\text{OXI})$ | $y = c(\text{ABZSO})/c(\text{OXI})$ |
|-----------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1K | 0,64 | 0,59 |
| 2K | 0,50 | 0,44 |
| 3K | 0,38 | 0,30 |
| 4K | 0,29 | 0,15 |

Graf 7: Kalibrační křivka ABZSO:



4.2.1.8. Kalibrační křivka 10x zředěného ABZSO v mobilní fázi, která má složení pufr:ACN=70:30

V tabulce 22 jsou uvedeny koncentrace ABZSO a OXI 10x zředěných roztoků a naměřené plochy příslušných píků. Poměry ploch ABZSO/OXI a poměry koncentrací ABZSO/OXI uvádí tabulka 23. Kalibrační křivka 10x zředěného ABZSO je v grafu 8.

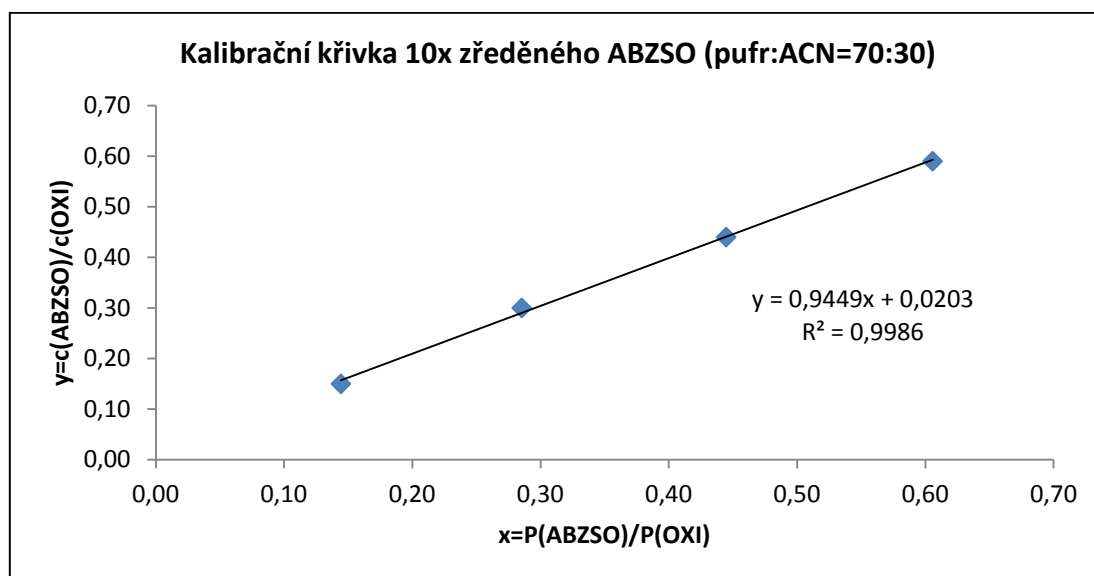
Tabulka 22: Koncentrace ABZSO a OXI a naměřené hodnoty příslušných ploch píků pro 10x zředěné roztoky:

| | c(ABZSO) $\mu\text{mol/l}$ | P(ABZSO) | c(OXI) $\mu\text{mol/l}$ | P(OXI) |
|-----------|----------------------------|----------|--------------------------|--------|
| 1Z | $4,22 \cdot 10^{-1}$ | 80,17 | $7,13 \cdot 10^{-1}$ | 132,34 |
| 2Z | $3,17 \cdot 10^{-1}$ | 57,40 | $7,13 \cdot 10^{-1}$ | 129,04 |
| 3Z | $2,11 \cdot 10^{-1}$ | 19,18 | $7,13 \cdot 10^{-1}$ | 67,20 |
| 4Z | $1,06 \cdot 10^{-1}$ | 20,03 | $7,13 \cdot 10^{-1}$ | 138,69 |

Tabulka 23: Poměry ploch píků ABZSO/OXI (x) a poměry koncentrací ABZSO/OXI (y) pro 10x zředěné roztoky:

| | $x = P(\text{ABZSO})/P(\text{OXI})$ | $y = c(\text{ABZSO})/c(\text{OXI})$ |
|-----------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1Z | 0,61 | 0,59 |
| 2Z | 0,44 | 0,44 |
| 3Z | 0,29 | 0,30 |
| 4Z | 0,14 | 0,15 |

Graf 8: Kalibrační křivka 10x zředěného ABZSO:



4.2.1.9. Kalibrační křivka 100x zředěného ABZSO v mobilní fázi, která má složení pufr:ACN=70:30

V tabulce 24 jsou uvedeny koncentrace ABZSO a OXI 100x zředěných kalibračních roztoků a naměřené plochy příslušných píků. Poměry ploch ABZSO/OXI a poměry koncentrací ABZSO/OXI uvádí tabulka 25. Kalibrační křivka 100x zředěného ABZSO je v grafu 9.

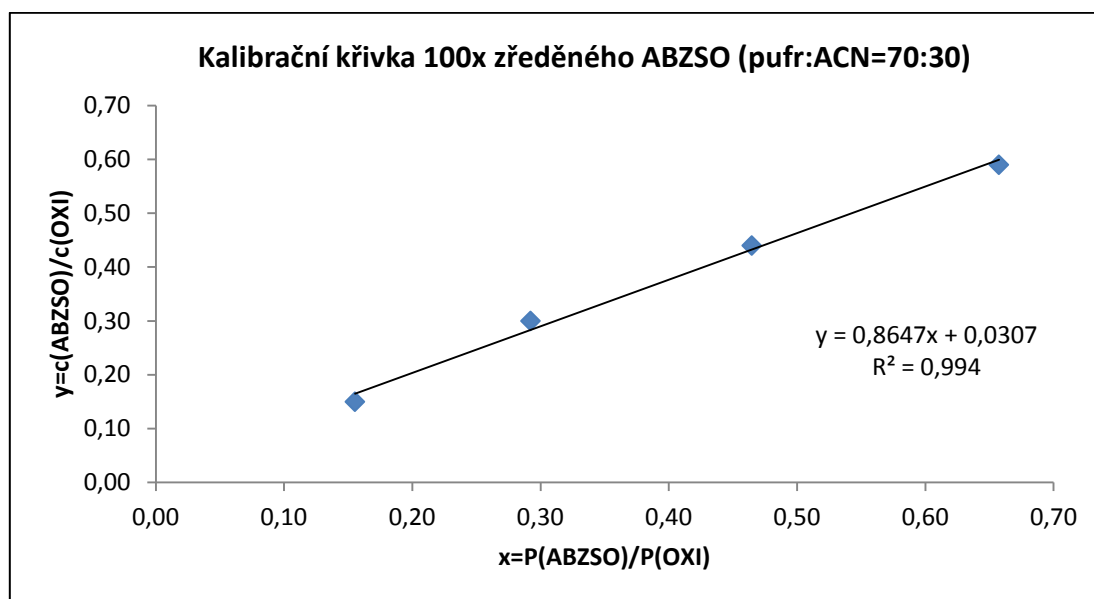
Tabulka 24: Koncentrace ABZSO a OXI a naměřené hodnoty příslušných ploch píků pro 100x zředěné roztoky:

| | c(ABZSO) $\mu\text{mol/l}$ | P(ABZSO) | c(OXI) $\mu\text{mol/l}$ | P(OXI) |
|------------|----------------------------|----------|--------------------------|--------|
| 1ZZ | $4,22 \cdot 10^{-2}$ | 8,36 | $7,13 \cdot 10^{-2}$ | 12,71 |
| 2ZZ | $3,17 \cdot 10^{-2}$ | 6,06 | $7,13 \cdot 10^{-2}$ | 13,04 |
| 3ZZ | $2,11 \cdot 10^{-2}$ | 4,10 | $7,13 \cdot 10^{-2}$ | 14,03 |
| 4ZZ | $0,74 \cdot 10^{-2}$ | 2,21 | $7,13 \cdot 10^{-2}$ | 14,23 |

Tabulka 25: Poměry ploch píků ABZSO/OXI (x) a poměry koncentrací ABZSO/OXI (y) pro 100x zředěné roztoky:

| | $x = P(\text{ABZSO})/P(\text{OXI})$ | $y = c(\text{ABZSO})/c(\text{OXI})$ |
|------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1ZZ | 0,66 | 0,59 |
| 2ZZ | 0,46 | 0,44 |
| 3ZZ | 0,29 | 0,30 |
| 4ZZ | 0,16 | 0,15 |

Graf 9: Kalibrační křivka 100x zředěného ABZSO:



4.2.2. Kalibrační křivky ABZ, ABZSO a ABZSO₂, použitá mobilní fáze měla složení H₂O:ACN=70:30

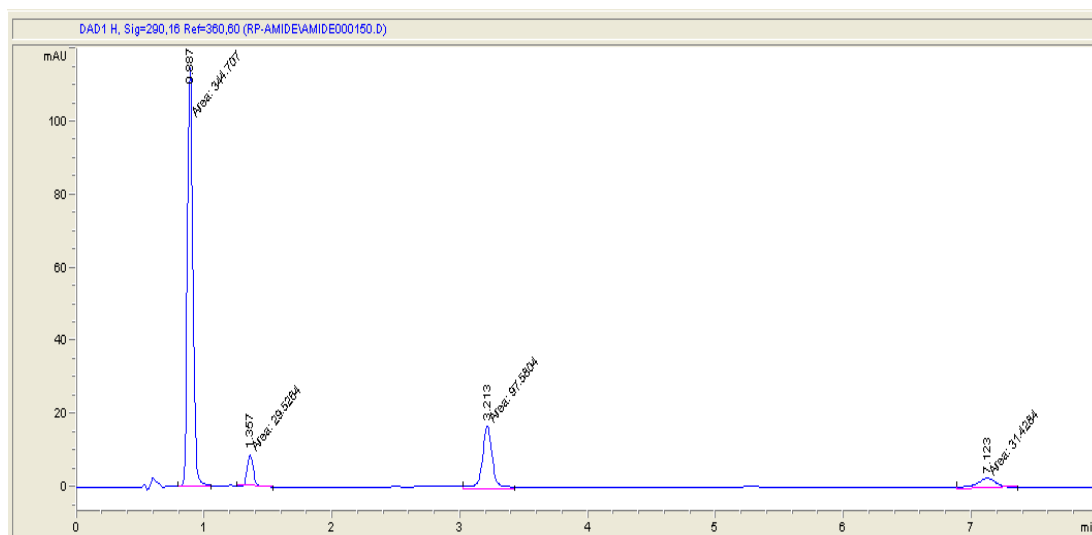
Složení základních roztoků (1K, 2K, 3K, 4K) je popsáno v tabulce 26. V tabulce jsou uvedeny jednotlivé koncentrace (c) zkoumaných látek.

Tabulka 26: Složení základních roztoků (1K, 2K, 3K, 4K):

| | c (ABZSO) μmol/l | c (ABZSO ₂) μmol/l | c (ABZ) μmol/l | c (OXI) μmol/l |
|-----------|---------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------|
| 1K | 4,22 | 2,00 | 4,47 | 7,13 |
| 2K | 3,17 | 1,50 | 3,35 | 7,13 |
| 3K | 2,11 | 1,00 | 2,23 | 7,13 |
| 4K | 1,06 | 0,50 | 1,12 | 7,13 |

Na obrázku 6 je chromatogram základního roztoku 1K. Použitá mobilní fáze měla složení H₂O:ACN=70:30.

Obrázek 6: Chromatogram základního roztoku 1K:



4.2.2.1. Kalibrační křivka pro ABZ v mobilní fázi, která má složení H₂O:ACN=70:30

V tabulce 27 jsou uvedeny koncentrace ABZ a OXI v jednotlivých základních roztocích a naměřené hodnoty příslušných ploch píků. Poměry ploch píků ABZ/OXI a poměry koncentrací ABZ/OXI jsou uvedeny v tabulce 28. Kalibrační křivka ABZ je na grafu 10.

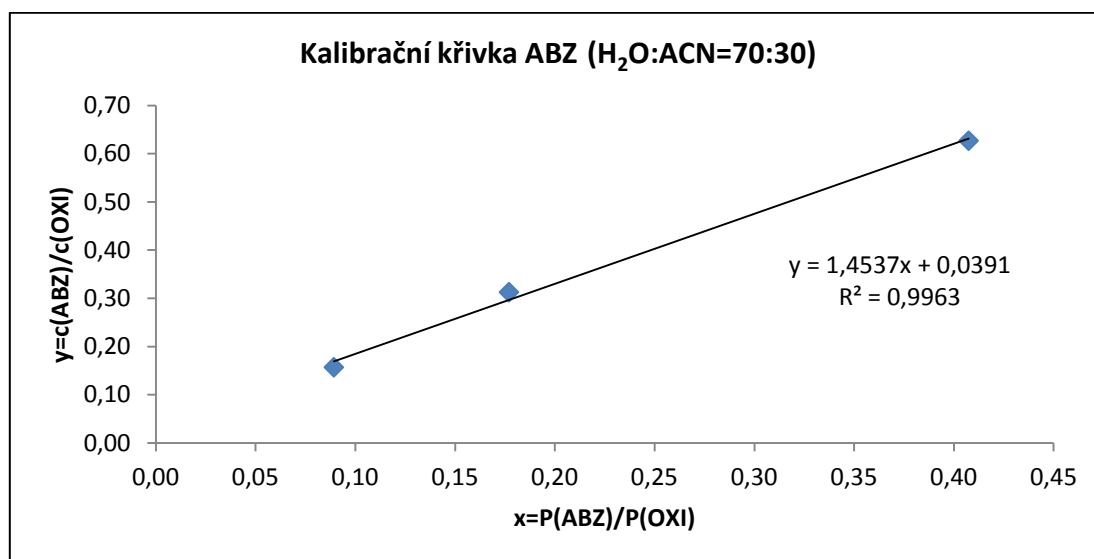
Tabulka 27: Koncentrace ABZ a OXI v základních roztocích a naměřené hodnoty příslušných ploch píků:

| | c(ABZ) $\mu\text{mol/l}$ | P(ABZ) | c(OXI) $\mu\text{mol/l}$ | P(OXI) |
|-----------|--------------------------|--------|--------------------------|--------|
| 1K | 4,47 | 29,51 | 7,13 | 72,42 |
| 2K | 3,35 | 26,96 | 7,13 | 69,73 |
| 3K | 2,23 | 13,14 | 7,13 | 74,21 |
| 4K | 1,12 | 6,52 | 7,13 | 73,01 |

Tabulka 28: Poměry ploch píků ABZ/OXI (x) a poměry koncentrací ABZ/OXI (y) pro základní roztoky:

| | $x = P(\text{ABZ})/P(\text{OXI})$ | $y = c(\text{ABZ})/c(\text{OXI})$ |
|-----------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1K | 0,41 | 0,63 |
| 2K | 0,39 | 0,47 |
| 3K | 0,18 | 0,31 |
| 4K | 0,09 | 0,16 |

Graf 10: Kalibrační křivka ABZ:



4.2.2.2. Kalibrační křivka 10x zředěného ABZ v mobilní fázi, která má složení H₂O:ACN=70:30

V tabulce 29 jsou uvedeny koncentrace ABZ a OXI 10x zředěných roztoků a naměřené plochy příslušných píků. Poměry ploch ABZ/OXI a poměry koncentrací ABZ/OXI uvádí tabulka 30. Kalibrační křivka 10x zředěného ABZ je v grafu 11.

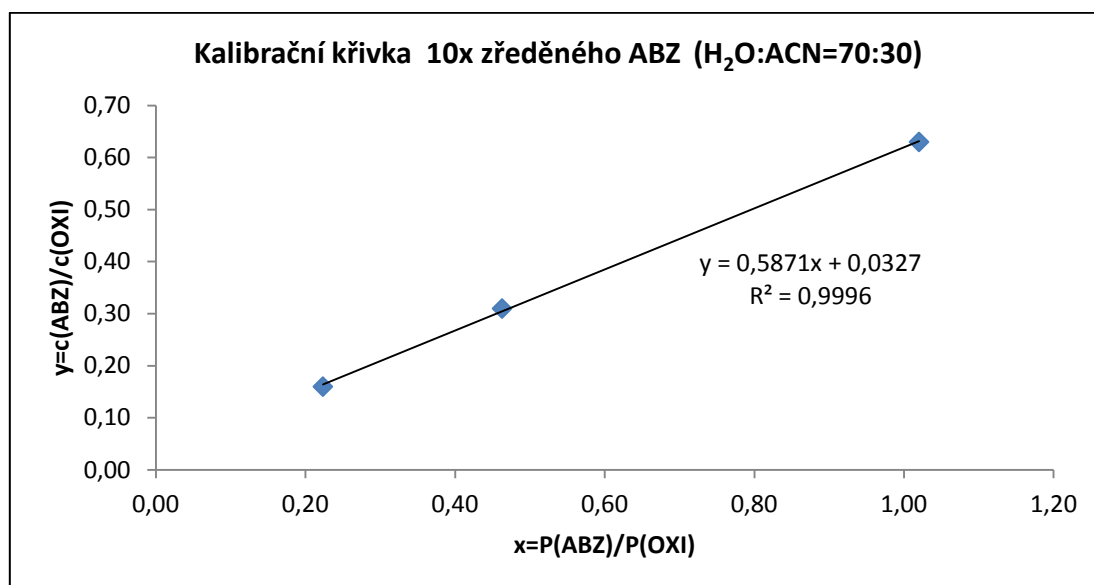
Tabulka 29: Koncentrace ABZ a OXI a naměřené hodnoty příslušných ploch píků pro 10x zředěné roztoky:

| | c(ABZ) $\mu\text{mol/l}$ | P(ABZ) | c(OXI) $\mu\text{mol/l}$ | P(OXI) |
|-----------|--------------------------|--------|--------------------------|--------|
| 1Z | $4,47 \cdot 10^{-1}$ | 152,43 | $7,13 \cdot 10^{-1}$ | 149,40 |
| 2Z | $3,35 \cdot 10^{-1}$ | 134,87 | $7,13 \cdot 10^{-1}$ | 138,67 |
| 3Z | $2,23 \cdot 10^{-1}$ | 35,56 | $7,13 \cdot 10^{-1}$ | 76,81 |
| 4Z | $1,12 \cdot 10^{-1}$ | 32,08 | $7,13 \cdot 10^{-1}$ | 143,56 |

Tabulka 30: Poměry ploch píků ABZ/OXI (x) a poměry koncentrací ABZ/OXI (y) pro 10x zředěné roztoky:

| | $x = P(\text{ABZ})/P(\text{OXI})$ | $y = c(\text{ABZ})/c(\text{OXI})$ |
|-----------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1Z | 1,02 | 0,63 |
| 2Z | 0,97 | 0,47 |
| 3Z | 0,46 | 0,31 |
| 4Z | 0,22 | 0,16 |

Graf 11: Kalibrační křivka 10x zředěného ABZ:



4.2.2.3. Kalibrační křivka 100x zředěného ABZ v mobilní fázi, která má složení H₂O:ACN=70:30

V tabulce 31 jsou uvedeny koncentrace ABZ a OXI 100x zředěných kalibračních roztoků a naměřené plochy příslušných píků. Poměry ploch ABZ/OXI a poměry koncentrací ABZ/OXI uvádí tabulka 32. Kalibrační křivka 100x zředěného ABZ je v grafu 12.

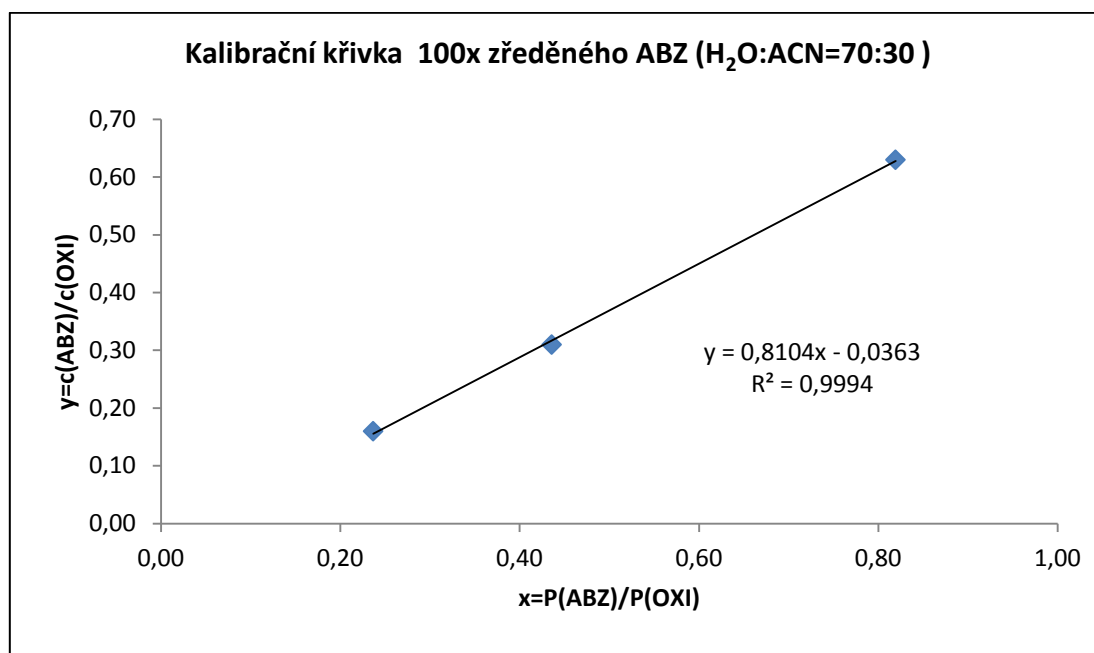
Tabulka 31: Koncentrace ABZ a OXI a naměřené hodnoty příslušných ploch píků pro 100x zředěné roztoky:

| | c(ABZ) $\mu\text{mol/l}$ | P(ABZ) | c(OXI) $\mu\text{mol/l}$ | P(OXI) |
|------------|--------------------------|--------|--------------------------|--------|
| 1ZZ | $4,47 \cdot 10^{-2}$ | 13,10 | $7,13 \cdot 10^{-2}$ | 15,99 |
| 2ZZ | $3,35 \cdot 10^{-2}$ | 10,96 | $7,13 \cdot 10^{-2}$ | 13,68 |
| 3ZZ | $2,23 \cdot 10^{-2}$ | 6,21 | $7,13 \cdot 10^{-2}$ | 14,25 |
| 4ZZ | $1,12 \cdot 10^{-2}$ | 3,14 | $7,13 \cdot 10^{-2}$ | 13,27 |

Tabulka 32: Poměry ploch píků ABZ/OXI (x) a poměry koncentrací ABZ/OXI (y) pro 100x zředěné roztoky:

| | $x = P(\text{ABZ})/P(\text{OXI})$ | $y = c(\text{ABZ})/c(\text{OXI})$ |
|------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1ZZ | 0,82 | 0,63 |
| 2ZZ | 0,80 | 0,47 |
| 3ZZ | 0,44 | 0,31 |
| 4ZZ | 0,24 | 0,16 |

Graf 12: Kalibrační křivka 100x zředěného ABZ:



4.2.2.4. Kalibrační křivka pro ABZSO₂ v mobilní fázi, která má složení H₂O:ACN=70:30

V tabulce 33 jsou uvedeny koncentrace ABZSO₂ a OXI v jednotlivých základních roztocích a naměřené hodnoty příslušných píků. Poměry ploch píků ABZSO₂/OXI a poměry koncentrací ABZSO₂/OXI jsou uvedeny v tabulce 34. Kalibrační křivka ABZSO₂ je v grafu 13.

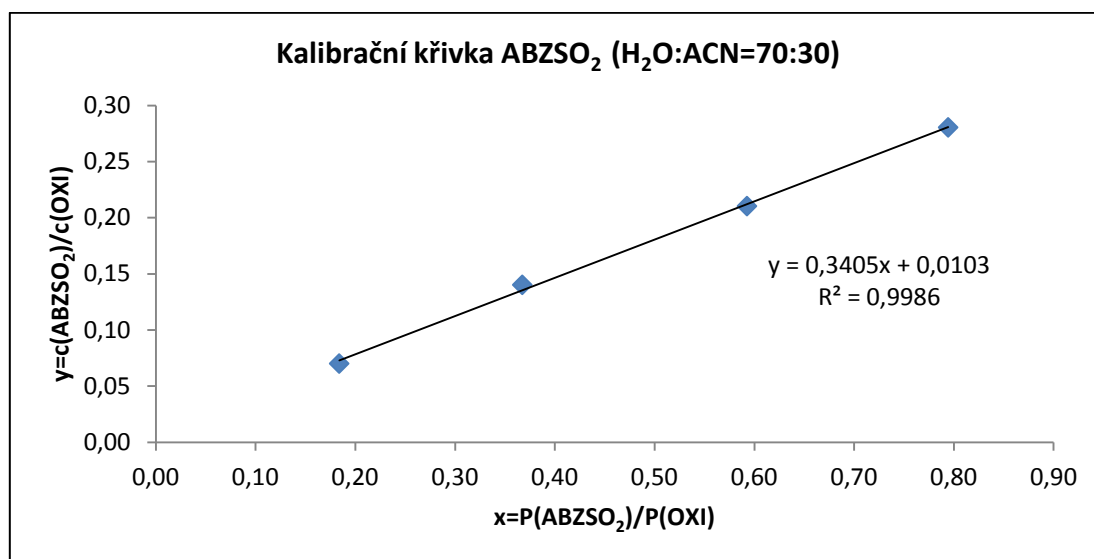
Tabulka 33: Koncentrace ABZSO₂ a OXI v základních roztocích a naměřené hodnoty příslušných ploch píků:

| | c(ABZSO ₂) μmol/l | P(ABZSO ₂) | c(OXI) μmol/l | P(OXI) |
|-----------|-------------------------------|------------------------|---------------|--------|
| 1K | 2,00 | 57,53 | 7,13 | 72,42 |
| 2K | 1,50 | 41,33 | 7,13 | 69,73 |
| 3K | 1,00 | 27,27 | 7,13 | 74,21 |
| 4K | 0,50 | 13,43 | 7,13 | 73,01 |

Tabulka 34: Poměry ploch píků ABZSO₂/OXI (x) a poměry koncentrací ABZSO₂/OXI (y) pro koncentrované roztoky:

| | x=P(ABZSO ₂)/P(OXI) | y=c(ABZSO ₂)/c(OXI) |
|-----------|---------------------------------|---------------------------------|
| 1K | 0,79 | 0,28 |
| 2K | 0,59 | 0,21 |
| 3K | 0,37 | 0,14 |
| 4K | 0,18 | 0,07 |

Graf 13: Kalibrační křivka ABZSO₂:



4.2.2.5. Kalibrační křivka 10x zředěného ABZSO₂ v mobilní fázi, která má složení H₂O:ACN=70:30

V tabulce 35 jsou uvedeny koncentrace ABZSO₂ a OXI 10x zředěných roztoků a naměřené plochy příslušných píků. Poměry ploch ABZSO₂/OXI a poměry koncentrací ABZSO₂/OXI uvádí tabulka 36. Kalibrační křivka 10x zředěného ABZSO₂ je v grafu 14.

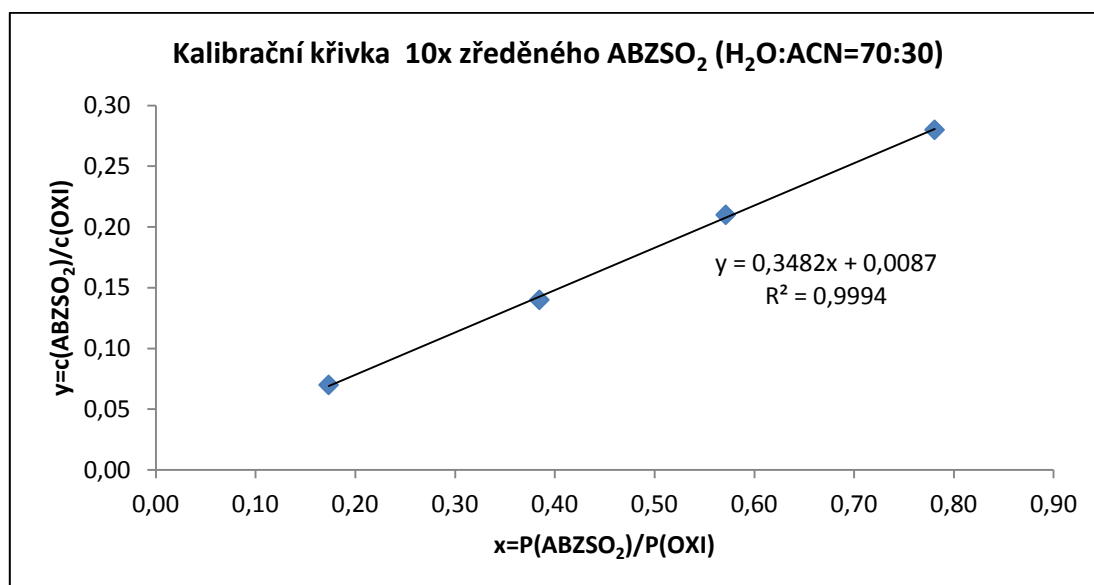
Tabulka 35: Koncentrace ABZSO₂ a OXI a naměřené hodnoty příslušných píků pro 10x zředěné roztoky:

| | c(ABZSO ₂) μmol/l | P(ABZSO ₂) | c(OXI) μmol/l | P(OXI) |
|-----------|-------------------------------|------------------------|-----------------------|--------|
| 1Z | 2,00*10 ⁻¹ | 5,70 | 7,13*10 ⁻¹ | 7,30 |
| 2Z | 1,50*10 ⁻¹ | 4,00 | 7,13*10 ⁻¹ | 7,00 |
| 3Z | 1,00*10 ⁻¹ | 1,50 | 7,13*10 ⁻¹ | 3,90 |
| 4Z | 0,50*10 ⁻¹ | 1,30 | 7,13*10 ⁻¹ | 7,50 |

Tabulka 36: Poměry ploch píků ABZSO₂/OXI (x) a poměry koncentrací ABZSO₂/OXI (y) pro 10x zředěné roztoky:

| | x=P(ABZSO ₂)/P(OXI) | y=c(ABZSO ₂)/c(OXI) |
|-----------|---------------------------------|---------------------------------|
| 1Z | 0,78 | 0,28 |
| 2Z | 0,57 | 0,21 |
| 3Z | 0,38 | 0,14 |
| 4Z | 0,17 | 0,07 |

Graf 14: Kalibrační křivka 10x zředěného ABZSO₂:



4.2.2.6. Kalibrační křivka 100x zředěného ABZSO₂ v mobilní fázi, která má složení H₂O:ACN=70:30

V tabulce 37 jsou uvedeny koncentrace ABZSO₂ a OXI 100x zředěných kalibračních roztoků a naměřené plochy příslušných píků. Poměry ploch ABZSO₂/OXI a poměry koncentrací ABZSO₂/OXI uvádí tabulka 38. Kalibrační křivka 100x zředěného ABZSO₂ je v grafu 15.

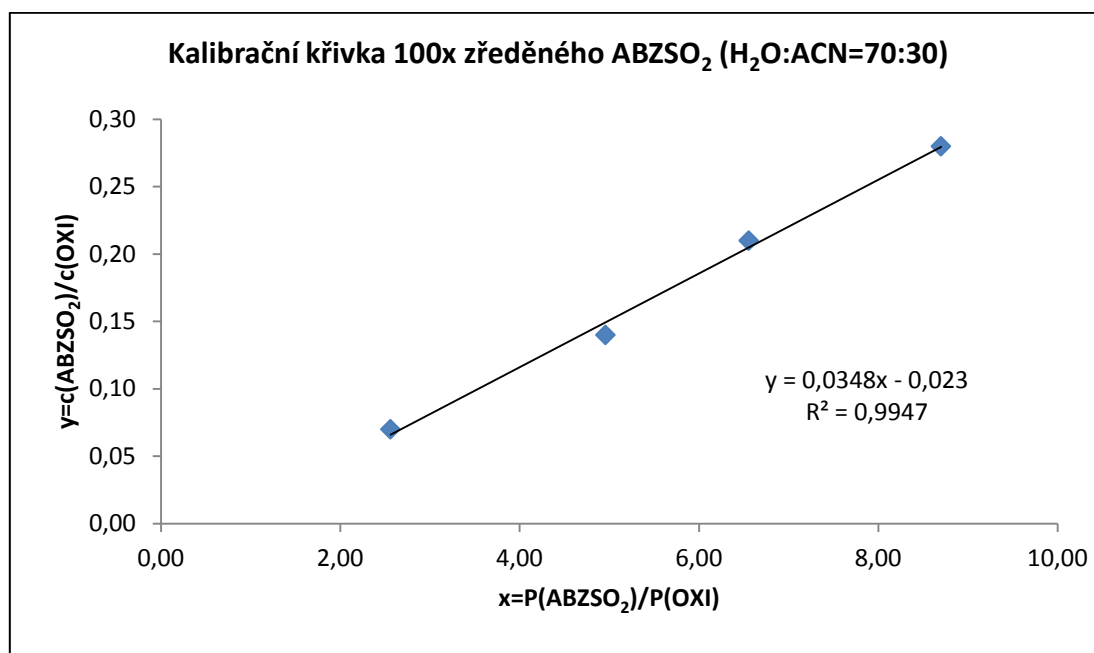
Tabulka 37: Koncentrace ABZSO₂ a OXI a naměřené hodnoty příslušných ploch píků pro 100x zředěné roztoky:

| | c(ABZSO ₂) μmol/l | P(ABZSO ₂) | c(OXI) μmol/l | P(OXI) |
|------------|-------------------------------|------------------------|-----------------------|--------|
| 1ZZ | 2,00*10 ⁻² | 139,11 | 7,13*10 ⁻² | 15,99 |
| 2ZZ | 1,50*10 ⁻² | 89,68 | 7,13*10 ⁻² | 13,68 |
| 3ZZ | 1,00*10 ⁻² | 70,64 | 7,13*10 ⁻² | 14,25 |
| 4ZZ | 0,50*10 ⁻² | 33,96 | 7,13*10 ⁻² | 13,27 |

Tabulka 38: Poměry ploch píků ABZSO₂/OXI (x) a poměry koncentrací ABZSO₂/OXI (y) pro 100x zředěné roztoky:

| | x=P(ABZSO ₂)/P(OXI) | y=c(ABZSO ₂)/c(OXI) |
|------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 1ZZ | 8,70 | 0,28 |
| 2ZZ | 6,56 | 0,21 |
| 3ZZ | 4,96 | 0,14 |
| 4ZZ | 2,56 | 0,07 |

Graf 15: Kalibrační křivka 100x zředěného ABZSO₂:



4.2.2.7. Kalibrační křivka pro ABZSO v mobilní fázi, která má složení H₂O:ACN=70:30

V tabulce 39 jsou uvedeny koncentrace ABZSO a OXI v jednotlivých základních roztocích a naměřené hodnoty ploch příslušných píků. Poměry ploch píků ABZSO/OXI a poměry koncentrací ABZSO/OXI jsou uvedeny v tabulce 40. Kalibrační křivka ABZSO je v grafu 16.

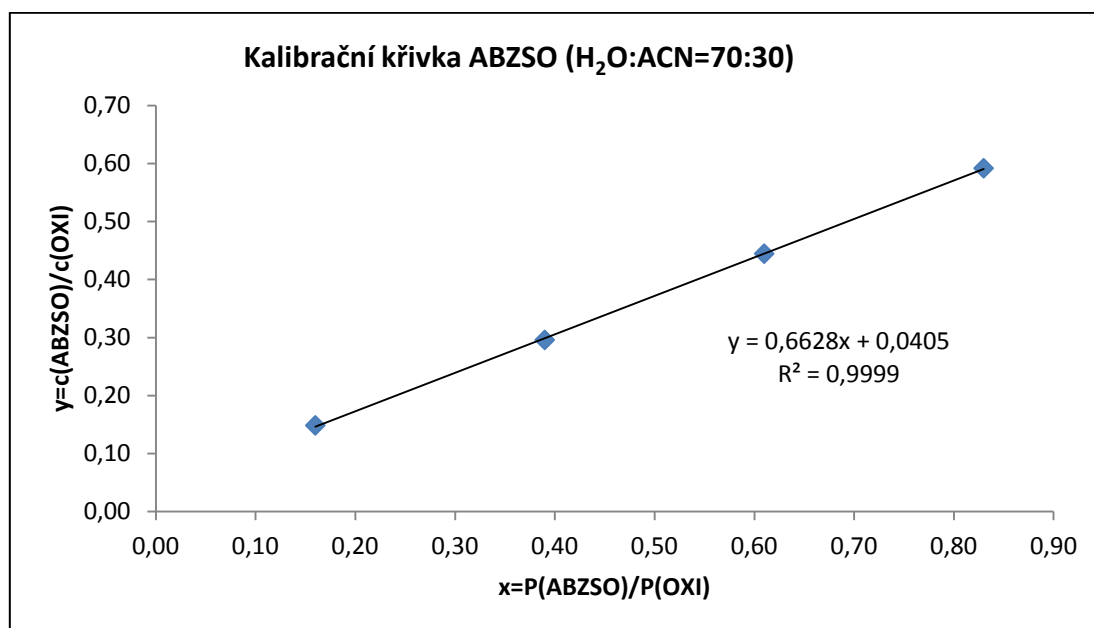
Tabulka 39: Koncentrace ABZSO a OXI v základních roztocích a naměřené hodnoty příslušných ploch píků:

| | c(ABZSO) $\mu\text{mol/l}$ | P(ABZSO) | c(OXI) $\mu\text{mol/l}$ | P(OXI) |
|-----------|----------------------------|----------|--------------------------|--------|
| 1K | 4,22 | 60,408 | 7,13 | 72,42 |
| 2K | 3,17 | 42,43 | 7,13 | 69,73 |
| 3K | 2,11 | 29,10 | 7,13 | 74,21 |
| 4K | 1,06 | 14,89 | 7,13 | 73,01 |

Tabulka 40: Poměry ploch ABZSO/OXI (x) a poměry koncentrací ABZSO/OXI (y) pro základní roztoky:

| | $x = P(\text{ABZSO})/P(\text{OXI})$ | $y = c(\text{ABZSO})/c(\text{OXI})$ |
|-----------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1K | 0,83 | 0,59 |
| 2K | 0,61 | 0,44 |
| 3K | 0,39 | 0,30 |
| 4K | 0,16 | 0,15 |

Graf 16: Kalibrační křivka ABZSO:



4.2.2.8. Kalibrační křivka 10x zředěného ABZSO v mobilní fázi, která má složení H₂O:ACN=70:30

V tabulce 41 jsou uvedeny koncentrace ABZSO a OXI 10x zředěných roztoků a naměřené plochy příslušných píků. Poměry ploch ABZSO/OXI a poměry koncentrací ABZSO/OXI uvádí tabulka 42. Kalibrační křivka 10x zředěného ABZSO je v grafu 17.

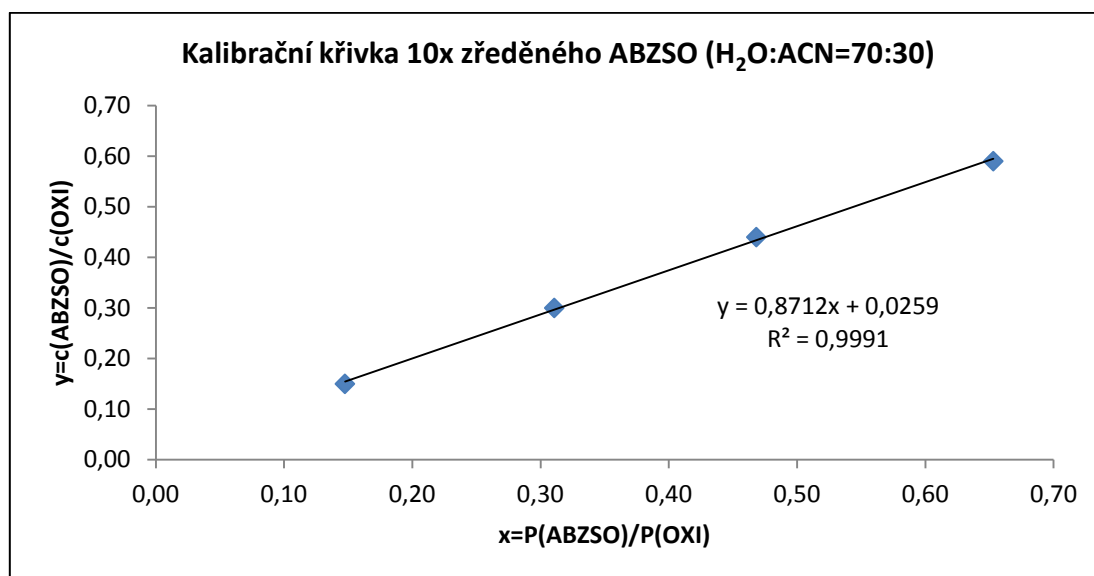
Tabulka 41: Koncentrace ABZSO a OXI a naměřené hodnoty příslušných ploch píků pro 10x zředěné roztoky:

| | c(ABZSO) $\mu\text{mol/l}$ | P(ABZSO) | c(OXI) $\mu\text{mol/l}$ | P(OXI) |
|-----------|----------------------------|----------|--------------------------|--------|
| 1Z | $4,22 \cdot 10^{-1}$ | 97,57 | $7,13 \cdot 10^{-1}$ | 149,40 |
| 2Z | $3,17 \cdot 10^{-1}$ | 64,94 | $7,13 \cdot 10^{-1}$ | 138,67 |
| 3Z | $2,11 \cdot 10^{-1}$ | 23,87 | $7,13 \cdot 10^{-1}$ | 76,81 |
| 4Z | $1,06 \cdot 10^{-1}$ | 21,18 | $7,13 \cdot 10^{-1}$ | 143,56 |

Tabulka 42: Poměry ploch píků ABZSO/OXI (x) a poměry koncentrací ABZSO/OXI (y) pro 10x zředěné roztoky:

| | $x = P(\text{ABZSO})/P(\text{OXI})$ | $y = c(\text{ABZSO})/c(\text{OXI})$ |
|-----------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1Z | 0,65 | 0,59 |
| 2Z | 0,47 | 0,44 |
| 3Z | 0,31 | 0,30 |
| 4Z | 0,15 | 0,15 |

Graf 17: Kalibrační křivka 10x zředěného ABZSO:



4.2.2.9. Kalibrační křivka 100x zředěného ABZSO v mobilní fázi, která má složení H₂O:ACN=70:30

V tabulce 43 jsou uvedeny koncentrace ABZSO a OXI 100x zředěných roztoků a naměřené plochy příslušných píků. Poměry ploch ABZSO/OXI a poměry koncentrací ABZSO/OXI uvádí tabulka 44. Kalibrační křivka 100x zředěného ABZSO je v grafu 18.

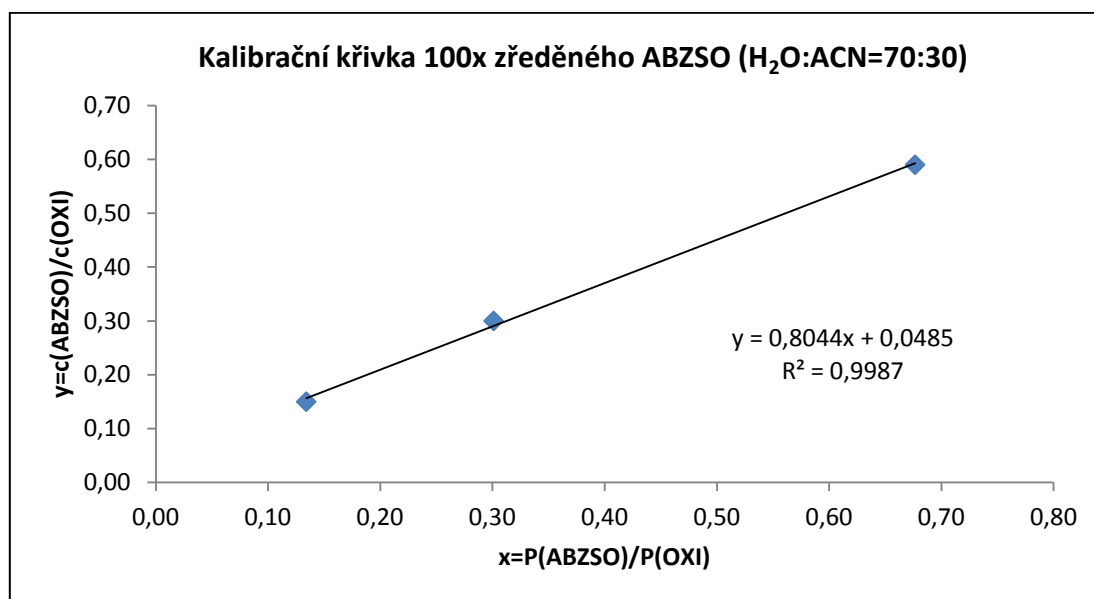
Tabulka 43: Koncentrace ABZSO a OXI a naměřené hodnoty příslušných ploch píků pro 100x zředěné roztoky:

| | c(ABZSO) $\mu\text{mol/l}$ | P(ABZSO) | c(OXI) $\mu\text{mol/l}$ | P(OXI) |
|------------|----------------------------|----------|--------------------------|--------|
| 1ZZ | $4,22 \cdot 10^{-2}$ | 10,82 | $7,13 \cdot 10^{-2}$ | 15,99 |
| 2ZZ | $3,17 \cdot 10^{-2}$ | 7,39 | $7,13 \cdot 10^{-2}$ | 13,68 |
| 3ZZ | $2,11 \cdot 10^{-2}$ | 4,29 | $7,13 \cdot 10^{-2}$ | 14,25 |
| 4ZZ | $0,74 \cdot 10^{-2}$ | 1,78 | $7,13 \cdot 10^{-2}$ | 13,27 |

Tabulka 44: Poměry ploch ABZSO/OXI (x) a poměry koncentrací ABZSO/OXI (y) pro 100x zředěné roztoky:

| | $x = P(\text{ABZSO})/P(\text{OXI})$ | $y = c(\text{ABZSO})/c(\text{OXI})$ |
|------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 1ZZ | 0,68 | 0,59 |
| 2ZZ | 0,54 | 0,44 |
| 3ZZ | 0,30 | 0,30 |
| 4ZZ | 0,13 | 0,15 |

Graf 18: Kalibrační křivka 100x zředěného ABZSO:



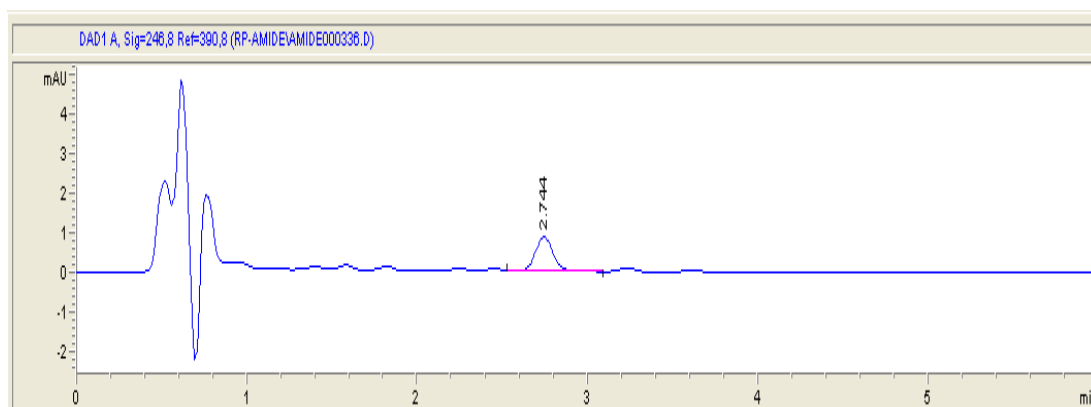
4.3. Slepý vzorek

Slepý vzorek jsem analyzovala kvůli vyjádření selektivity. Tento vzorek byl připraven na katedře biochemických věd FaF UK extrakcí rozemletého parazita *Haemonchus contortus* ethylacetátem. Po odpaření ethylacetátu byl rekonstituován v mobilní fázi.

Po analýze slepého vzorku se na chromatogramu objevil pouze systémový pík a pík neznámého rezidua z biologického materiálu. Ani jeden z těchto píků nekoeluuje s píkem žádné ze zkoumaných látek.

Chromatogram slepého vzorku je na obrázku 7. Použitá mobilní fáze měla složení $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}=70:30$.

Obrázek 7: Chromatogram slepého vzorku:



4.4. Stanovení opakovatelnosti retenčních časů a ploch píků

Provedla jsem 10 paralelních měření pro vzorek obsahující ABZSO, ABZSO₂, OXI a ABZ. V tabulce 45 jsou uvedeny naměřené hodnoty a vypočítané průměry a směrodatné odchylky pro ABZSO. Naměřené a vypočítané hodnoty pro ABZSO₂ jsou uvedeny v tabulce 46, pro OXI v tabulce 47 a pro ABZ v tabulce 48. Použitá mobilní fáze měla složení H₂O:ACN=70:30.

Tabulka 45: Retenční časy a plochy píků pro ABZSO:

| ABZSO | | |
|----------------------------|----------------|--------------|
| měření | ret. čas (min) | plocha |
| Real 1 | 0,924 | 45,84 |
| Real 2 | 0,924 | 41,63 |
| Real 3 | 0,923 | 42,47 |
| Real 4 | 0,922 | 41,33 |
| Real 5 | 0,922 | 43,75 |
| Real 6 | 0, 922 | 42,91 |
| Real 7 | 0,921 | 44,28 |
| Real 8 | 0,922 | 44,36 |
| Real 9 | 0,921 | 44,92 |
| Real 10 | 0,921 | 44,50 |
| průměr | 0,922 | 43,60 |
| směrodatná odchylka | 0,001 | 1,47 |

Z těchto naměřených hodnot byla stanovena opakovatelnost retenčního času pro ABZSO s následujícím výsledkem:

Průměrná hodnota stanovení retenčního času **0,922**

Relativní směrodatná odchylka **0,001**

Dále byla z těchto měření stanovena opakovatelnost plochy pro ABZSO s následujícím výsledkem:

Průměrná hodnota stanovení plochy **43,60**

Relativní směrodatná odchylka **1,47**

Tabulka 46: Retenční časy a plochy píků pro ABZSO₂:

| ABZSO₂ | | |
|----------------------------|-----------------------|---------------|
| měření | ret. čas (min) | plocha |
| Real 1 | 1,413 | 504,58 |
| Real 2 | 1,438 | 501,88 |
| Real 3 | 1,413 | 499,81 |
| Real 4 | 1,436 | 503,27 |
| Real 5 | 1,405 | 504,95 |
| Real 6 | 1,415 | 506,23 |
| Real 7 | 1,419 | 506,34 |
| Real 8 | 1,414 | 506,55 |
| Real 9 | 1,419 | 510,23 |
| Real 10 | 1,433 | 507,92 |
| průměr | 1,421 | 505,06 |
| směrodatná odchylka | 0,011 | 3,16 |

Z těchto naměřených hodnot byla stanovena opakovatelnost retenčního času pro ABZSO₂ s následujícím výsledkem:

Průměrná hodnota stanovení retenčního času **1,421**

Relativní směrodatná odchylka **0,011**

Dále byla z těchto měření stanovena opakovatelnost plochy pro ABZSO₂ s následujícím výsledkem:

Průměrná hodnota stanovení plochy **505,06**

Relativní směrodatná odchylka **3,16**

Tabulka 47: Retenční časy a plochy píků pro OXI:

| OXI | | |
|----------------------------|-----------------------|---------------|
| měření | ret. čas (min) | plocha |
| Real 1 | 3,257 | 64,36 |
| Real 2 | 3,254 | 64,92 |
| Real 3 | 3,251 | 65,22 |
| Real 4 | 3,247 | 65,57 |
| Real 5 | 3,243 | 65,57 |
| Real 6 | 3,250 | 66,03 |
| Real 7 | 3,238 | 66,56 |
| Real 8 | 3,236 | 67,84 |
| Real 9 | 3,235 | 67,39 |
| Real 10 | 3,234 | 66,49 |
| průměr | 3,245 | 66,00 |
| směrodatná odchylka | 0,008 | 1,09 |

Z těchto naměřených hodnot byla stanovena opakovatelnost retenčního času pro OXI s následujícím výsledkem:

Průměrná hodnota stanovení retenčního času **3,245**

Relativní směrodatná odchylka **0,008**

Dále byla z těchto měření stanovena opakovatelnost plochy pro OXI s následujícím výsledkem:

Průměrná hodnota stanovení plochy **66,00**

Relativní směrodatná odchylka **1,09**

Tabulka 48: Retenční časy a plochy píků pro ABZ:

| ABZ | | |
|----------------------------|-----------------------|---------------|
| měření | ret. čas (min) | plocha |
| Real 1 | 7,150 | 105,05 |
| Real 2 | 7,150 | 104,75 |
| Real 3 | 7,147 | 104,86 |
| Real 4 | 7,141 | 106,68 |
| Real 5 | 7,136 | 106,88 |
| Real 6 | 7,142 | 107,81 |
| Real 7 | 7,124 | 110,62 |
| Real 8 | 7,106 | 108,71 |
| Real 9 | 7,104 | 108,66 |
| Real 10 | 7,102 | 107,54 |
| průměr | 7,130 | 107,16 |
| směrodatná odchylka | 0,020 | 1,92 |

Z těchto naměřených hodnot byla stanovena opakovatelnost retenčního času pro ABZ s následujícím výsledkem:

Průměrná hodnota stanovení retenčního času **7,130**

Relativní směrodatná odchylka **0,020**

Dále byla z těchto měření stanovena opakovatelnost plochy pro ABZ s následujícím výsledkem:

Průměrná hodnota stanovení plochy **107,16**

Relativní směrodatná odchylka **1,92**

5.DISKUZE

Cílem této práce bylo nalezení vhodné mobilní fáze pro HPLC analýzu albendazolu a jeho metabolitů za použití core-shell kolony Ascentis® Express RP-Amide a sestrojení kalibračních křivek pro stanovení koncentrací zkoumaných benzimidazolů.

V první části diplomové práce jsem hledala optimální složení mobilní fáze. Kombinovala jsem vždy dvě rozpouštědla s různou polaritou a v různých poměrech a sledovala, při kterých kombinacích vycházejí jednotlivé retenční časy zkoumaných benzimidazolů nejlépe. Retence jednotlivých benzimidazolů závisí na jejich hydrofobicitě. Čím více je látka hydrofobní, tím má delší retenční čas, protože je na koloně déle zadržována⁹⁾. Nejvhodnější mobilní fáze pro další měření mají složení H₂O:ACN=70:30 a fosfátový pufr:ACN=70:30. Jiná složení mobilní fáze se neosvědčila, protože buď je analýza časově náročná, nebo mají některé benzimidazoly v podstatě shodné retenční časy a při analýze jejich směsi by mohly jejich píky koeluovat. Obrázky 5 a 6 ukazují, že separace všech čtyř látek je za nalezených podmínek výborná a doba analýzy je velmi krátká. Použitím kolony Ascentis® Express RP-Amide bylo dosaženo mnohem lepší separace než v případě kolon s náplní C18. Se stacionární fází C18 hledala vhodné podmínky pro HPLC Coufalová¹⁰⁾, ale nedosáhla uspokojivých výsledků. Podobně někteří další autoři, kteří používali tuto stacionární fázi, případně stacionární fázi C8, popisují problémy při jejich použití^{11), 12), 13), 14)}. Výborných výsledků při separaci albendazolu a jeho metabolitů s vnitřním standardem oxibendazolem dosáhla Belešová¹⁵⁾, která použila core-shell kolonu Ascentis® Express F5. Stacionární fází v této koloně je pentafluorofenyl, který je vázán k silikagelovému nosiči přes propylové můstky. V této práci je podle Snyderova modelu¹⁶⁾ proveden výpočet, který ukazuje, že ortogonální stacionární fáze k fázi C18 jsou právě F5 a RP-Amide. Z tohoto pohledu jsou výsledky uvedené v této práci a výsledky Belešové ve shodě, protože se v obou případech podařilo najít výborné separační podmínky.

Náplní této diplomové práce nebylo hledání detekčních podmínek. Fluorescenční detekci úspěšně vyzkoušela Belešová¹⁵⁾, která dosáhla s touto detekcí velmi nízkých detekčních limitů, přičemž používala mobilní fázi podobnou jedné z mobilních fází nalezených v této práci (fosfátový pufr:ACN). Pro fluorescenční detekci by byla zřejmě vhodná i mobilní fáze H₂O:ACN. Na rozdíl od mobilních fází, které obsahují fosfátový pufr, je mobilní fáze H₂O:ACN použitelná i pro MS detekci¹⁷⁾.

V druhé části diplomové práce jsem testovala linearitu odezvy diode-array detektoru v širokém koncentračním rozmezí. Připravila jsem různě koncentrované roztoky benzimidazolů a pro obě mobilní fáze zkoumala závislost plochy píků analytů na jejich koncentraci. Výsledkem jsou kalibrační křivky pro albendazol a jeho metabolity. Kalibrační křivky se podařilo sestavit i pro velmi nízké koncentrace albendazolu a jeho metabolitů. V případě použití tohoto způsobu detekce u konkrétních biologických vzorků bude třeba ověřit kalibrace za použití biologických kalibračních vzorků. V této práci je otestována pouze selektivita na slepém vzorku *Haemonchus contortus*.

6.ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo otestovat použitelnost core-shell kolony pro separaci albendazolu a jeho metabolitů za použití oxibendazolu jako vnitřního standardu. Podařilo se nalézt podmínky pro separaci všech čtyř látek (albendazol, albendazol sulfoxid, albendazol sulfon a oxibendazol). Separace je za použití testované kolony výborná, všechny látky jsou na chromatogramech zcela odděleny. K tomu je možné použít dvou různých složení mobilní fáze.

Za použití UV detekce byly sestrojeny kalibrační křivky albendazolu a obou jeho metabolitů v širokém koncentračním rozsahu. Selektivita byla ověřena analýzou slepého vzorku.

Použitá literatura a zdroje

- 1) Lamka J., Ducháček L.: Veterinární léčiva pro posluchače farmacie, Karolinum, Praha 2008, str. 64-65.
- 2) Danaher M., De Ruyck H., Crooks S. R. H., Dowling G., O'Keeffe H. M.: J. Chromatogr. B 845 (2007), 1-37.
- 3) Ducháček L., Lamka J.: Veterinární vademecum pro farmaceuty, Karolinum, Praha 2006, str. 19-20.
- 4) Richtrová M.: Diplomová práce, Katedra biofyziky a fyzikální chemie, Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2009.
- 5) Klimeš J. a kolektiv: Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami, Nukleus HK[®], Hradec Králové 2011, str. 36-40.
- 6) Moodle pro výuku Univerzity Karlovy, kurz Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze, Téma 1: HPLC – Historie a základní principy.
<http://dl1.cuni.cz/mod/resource/view.php?id=149771>
Staženo 12.3.2014.
- 7) <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=21312879>
Staženo dne 1.2.2014.
- 8) <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/brochures/ascentis-express-rp-amide.html>
Staženo dne 1.2.2014.
- 9) <http://web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/3%20HPLC%202013%20Mobiln%C3%AD%20f%C3%A1ze.pdf>
Staženo dne 22.4.2014.

- 10) Coufalová I.: Diplomová práce, Katedra biofyziky a fyzikální chemie, Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2011.
- 11) Wu Z., Medlicott N.J., Razzak M., Tucker I.G.: J. Pharm. Biomed. Anal. 39 (2005), 225-232.
- 12) Mirfazaelian A., Dadashzadeh S., Rouini M. R.: J. Pharm. Biomed. Anal. 30 (2002), 1249-1254.
- 13) Sarin R., Dash A.P., Dua V.K.: J. Chromatogr. B 799 (2004), 233-238.
- 14) Tyrnová L.: Diplomová práce, Katedra biofyziky a fyzikální chemie, Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2011.
- 15) Belešová M.: Rigorózní práce, Katedra biofyziky a fyzikální chemie, Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2013.
- 16) Snyder L.R., Dolan J.W., Carr P.W.: J. Chromatogr. A 1060 (2004), 77-116.
- 17) Cech N. B., Enke C. G.: Mass Spectrom. Rev. 20 (2001), 362-387.